

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**“Sexaje molecular a partir de heces en osos de anteojos
(Tremarctos ornatus)”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Cristina Sofía Caselli Schrader

Lima – Perú

2013

El presente estudio fue realizado en la Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y financiado por el Vicerrectorado de Investigación y la Facultad de Medicina Veterinaria - UNMSM

Dedicatoria

A Dios, A mis amados padres,
Alfredo Caselli y Roomy Schrader
 , a mi hermana Roomy,
A mis Abuelitos Javier y Leticia; Carlos y Cristina
 , a mis perros y gatitos que son muchos
 y a todos los osos de anteojos.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor y amigo el Dr. Lenin Maturrano por sus enseñanzas y consejos en la realización de este trabajo, como en el día a día.

Al Dr. Raúl Rosadio por permitirme ingresar al laboratorio y por la confianza depositada en mí.

A Juan Manuel Aguilar por su amistad, y por brindarme sus conocimientos y enseñanzas en la realización de este estudio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biología y Genética Molecular de la FMV-UNMSM, quienes colaboraron directa y indirectamente en la realización de este trabajo: Raquel Hurtado, Nataly Allasi, Daniel Fernández, Roció Rímac, Jorge Guerra y Andrea Soto

A las instituciones: Zoológico Parque de las leyendas, Zoológico Huachipa, Zoológico de Huancayo y al colegio la inmaculada, gracias a todas por brindarme las muestras para la realización del presente estudio.

A Julio Paredes por donar sangre para la realización del control humano usado en los PCR, por ayudarme a traducir varios artículos científicos y por su apoyo y cariño en todo momento.

ÍNDICE

Dedicatoria.	i
Agradecimientos	ii
Resumen	vi
Abstract.	vii
Abreviaturas.	viii
Lista de Cuadros.	xi
Lista de figuras.	x
I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica.	3
2.1 Descripción General De La Especie.	3
2.1.1 Generalidades y taxonomía.	3
2.1.2 Características físicas.	4
2.1.3 Distribución geográfica.	5
2.1.4 Alimentación.	6
2.1.5 Comportamiento.	7
2.2 Estado De Conservación.	9
2.2.1 Importación del oso en el medio ambiente.	9
2.2.1.2 Mantenimiento de Cuencas Hidrográficas.	10
2.2.1.3 Beneficios para la biodiversidad.	10
2.2.2 Estatus de la especie y Amenazas.	12
2.2.3 Esfuerzos para su conservación.	14
2.3 Determinación de sexo en mamíferos.	17
2.3.1 Determinación de sexo en animales silvestres mediante técnicas Invasivas.	18
2.3.2 Determinación del sexo en animales silvestres mediante técnicas no invasivas.	19

2.3.2.1 Muestras no invasivas como fuente de ADN en mamíferos	
Silvestres.	19
2.3.2.1.1 ADN de muestras de heces.	20
2.3.2.1.2 ADN de muestras de pelos.	21
2.3.2.2 Técnicas moleculares para la determinación de sexo en animales	
silvestres.	23
2.3.2.2.1 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de	
Restricción (RFLP).	23
2.3.2.2.2 Amplificación aleatoria de ADN	
polimórfico (RAPD).	24
2.3.2.2.3 Reacción En Cadena De La	
Polimerasa (PCR).	25
2.3.2.3 Marcadores Moleculares más usados para sexado.	26
2.3.2.3.1 Gen SRY.	26
2.3.2.3.2 Gen Amelogenina.	28
III. Materiales y metidos.	29
3.1 Materiales.	29
3.1.1 Poblaciones de estudio.	29
3.1.2 Lugar de estudio.	31
3.2 Métodos.	
3.2.1 Colección y conservación de muestras no invasivas.	32
3.2.2. Transporte de muestras.	33
3.2.3 Extracción de ADN.	34
3.2.4 Amplificación de ADN mediante PCR.	36
3.2.4.1 Optimización de la amplificación del gen	
amelogenina (SE47-SE48).	36
3.2.4.1.1 Condiciones del PCR.	37

3.2.3.2 Optimización de la amplificación del gen SRY (SRYB3-SRYB5).	37
3.2.3.2.1 Condiciones del PCR.	38
3.2.5 Electroforesis.	38
IV. Resultados.	40
4.1 obtención de ADN de muestras de heces en osos de anteojos.	40
4.2 Obtención de la amplificación del gen Amelogenina con los primer SE47 y SE48 mediante PCR.	41
4.3 Obtención de la amplificación del gen SRY con los primers SRYB3 –SRYB5 mediante PCR.	42
V. Discusión.	45
VI. Conclusiones.	48
VII. Recomendaciones.	49
VIII. Literatura citada.	50

RESUMEN

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) es una de las ocho especies de osos que existen en el mundo y gran parte de su población se encuentra en la región andino amazónica del Perú. Actualmente se encuentra vulnerable debido a la caza y destrucción de su medio ambiente. A esta vulnerabilidad se le suma su difícil avistamiento en vida libre lo que obstaculiza su manejo e investigación. Por lo que la utilización de muestras no invasivas como heces se vuelven en una gran herramienta. El objetivo del presente estudio fue desarrollar una técnica de sexado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de ADN extraído de células exfoliadas del colon presentes en muestras de heces. Para ello se utilizaron 17 muestras (10 de hembras y 7 de machos) obtenidas de osos de sexo conocido provenientes de 4 instituciones: (1) Patronato del parque de las leyendas (PATPAL), (2) parque zoológico Huachipa, (3) zoológico de Huancayo y (4) el zoocriadero del colegio La Inmaculada. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit de QIAGEN, extrayéndose de todas las muestras ADN a concentraciones de 20 - 30 ng. Mediante PCR se evaluó dos secuencias de genes: amelogenina con los primers SE47-SE48 y la región determinante del sexo en el cromosoma Y (SRY) con los primers SRYB3- SRYB5. Con el gen de amelogenina se logró sexar a 17/17 osos (100%), mientras que con el gen SRY no se logró el sexado (0/17; 0%). Se concluye que con el gen amelogenina hay una coincidencia de 100% entre el sexo conocido y el sexo hallado mediante PCR de ADN extraído de heces y puede ser usado en futuros estudios como marcador genético en la determinación del sexo.

Palabras claves: oso de anteojos, sexado, gen de amelogenina, SRY, PCR, heces

ABSTRACT

The spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) is one of the eight species of bears in the world and much of its population is in the Andean Amazon region of Peru. Nowadays it is considered vulnerable due to hunting and destruction of its environment. In addition to this vulnerability is added its difficult sighting which hampers their management and research. Therefore, the use of non-invasive samples such as stool becomes a great tool. The objective of this study was to develop a technique for sexing by polymerase chain reaction (PCR) of DNA extracted from exfoliated colon cells present in stool samples. To accomplish it, 17 samples (10 females and 7 males) were obtained from known sex bears from 4 institutions: (1) “Patronato del parque de las leyendas” (PATPAL) , (2) “Huachipa Zoo”, (3) “Huancayo Zoo” and (4) “Zoocriadero la Inmaculada” . DNA extraction was made with the commercial kit QIAamp ® DNA Stool Mini Kit from QIAGEN, DNA was extracted from all samples at concentrations of 20-30 ng. Two gene sequences were evaluated using PCR: Amelogenin with SE48 and SE47 primers and the sex determining region in the Y chromosome (SRY) with SRYB5 and SRYB3 primers. When using Amelogenin gene sexing was achieved at 17/17 bears (100%). However, when using SRY gene no sexing was achieved (0/17, 0%). In conclusion, Amelogenin gene matches 100% between known sex and sex found by PCR of DNA extracted from stool and can be used in future studies as a genetic marker in sex determination.

Keywords: spectacled bear, sexed, amelogenin gene, SRY, PCR, stool

ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
CITES:	The Convention on International Trade in Endangered Species
CRCLL:	Parque Zoológico de Huancayo.
dNTPs:	Dinucleotidos
INRENA:	Instituto Nacional de Recursos Naturales
IUCN:	International Union for Conservation of Nature,
KCl:	Cloruro de potasio
MgCl₂:	Cloruro de magnesio
Pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción En Cadena De La Polimerasa
RAPD:	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RFLP:	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
SRY:	Sex determining región del cromosoma Y
Taq:	<i>Thermus aquaticus</i>
TDF:	Testis determining factor
WWF:	World Wide Fund for Nature

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: identificación de los osos de anteojos muestreados.	30
Cuadro 2: Primer SE47 –SE48.	36
Cuadro 3: Condiciones del PCR para los primer SE47 – SE48.	37
Cuadro 4: Primer SRYB3 – SRYB5.	37
Cuadro 5: Condiciones del PCR para los primer SRYB3 – SRYB5.	38
Cuadro 6: Sexo obtenido por PCR usando los primer SE47- SE48 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).	43
Cuadro 7: Sexo obtenido por PCR usando los primer SRYB3- SRYB5 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Tipos de osos en el mundo.	3
Figura 2: Disposición de manchas amarillentas en la cabeza del oso de antejo.	4
Figura 3: Distribución geográfica del oso de anteojos.	6
Figura 4: Oso de anteojos alimentándose de bromelias en bosque húmedo.	7
Figura 5: Osezno de oso de anteojos descansando durante el día en la reserva de Chaparrí, Lambayeque-Perú.	8
Figura 6: Oso de anteojos descansando en un nido elaborado por él.	9
Figura 7: Oso de anteojos desplazándose, cumple función de polinizador a través de su pelaje. Parque Arqueológico y Ecológico de Batán Grande-Ferreñafe.	11
Figura 8: Estatus del oso de anteojos según Libro Rojo de la UICN, 2012.	13
Figura 9: Deforestación por cultivos de granadilla en habitat del oso de anteojos, Oxapampa- Perú, 2011.	13
Figura10: Oso andino recién cazado. Su carne sirvió de alimento para el cazador y su familia. Esta fotografía fue tomada en Yanatile a mediados del 2001.	14

	Pág.
Figura 11: Área de conservación privada Chaparrí – Lambayeque.- Fuente: Oso andino Historia natural.	16
Figura 12: Oso de anteojos en Parque zoológico Huachipa. El de la izquierda es macho y la de la derecha es hembra.	18
Figura13: recolección de heces en campo.	21
Figura 14: recolección de pelos de trampas de púas colocadas en campo.	22
Figura 15: representación esquemática del principio genético: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP).	23
Figura 16: Representación esquemática del principio genético: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD).	24
Figura 17: Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción.	26
Figura 18: Ubicación del gen SRY en cromosoma.	27
Figura 19: Ubicación del gen Amelogenina en cromosoma X e Y.	28
Figura 20: Lugares de colecta de muestras.	29
Figura 21: Osos de anteojos muestreados. A: ejemplar macho: Yogui. B: ejemplar macho: Hujo. C: ejemplar hembra: Luna. D: el del fondo es macho: Bubu, y la otra es hembra: Cindy. Las fotos A, C, D pertenecen al parque de las leyendas. La foto B pertenece al zoológico Huachipa.	31
Figura 22: Toma de muestra en zoológico Huachipa.	32

	Pág.
Figura 23: Tipos de heces, A: líquida; B: semilíquida; C: pastosa; D: en bloques.	33
Figura 24: Materiales para toma de muestra.	34
Figura 25: Extracción de ADN de heces de oso de anteojos.	35
Figura 26: A: Agitando muestras por 15 minutos con ayuda del vortex. B: Lisado material fecal extraído con 3-4 ml de buffer de lisado (ASL) después de 4 días.	35
Figura 27: Depositando los productos del PCR en el gel de agarosa al 3%.	39
Figura 28: Gel de agarosa al 0.8%. En los pocillos de 1 -14 se muestra la calidad y cantidad de ADN extraído a partir de muestras de heces en osos de anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).	40
Figura 29: Visualización de productos de PCR en gel de electroforesis al 3%. Usando los primer SE47 y SE48 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).	41
Figura 30: Visualización de productos de PCR en gel de electroforesis al 3%. Usando los primer SRYB3 –SRYB5 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (<i>Tremarctos ornatus</i>).	42

I. INTRODUCCIÓN

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) también conocido como el oso andino, frontino, ucucu o ucumari, es una de las ocho especies de osos que existen en el planeta y vive en la región andino amazónica de América del Sur. Ocupa los territorios de Venezuela, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y la zona norte de Argentina, en ambas vertientes de la Cordillera de los Andes. Habita ecosistemas que van desde los 250 m sobre el nivel del mar en el desierto costero y hasta los 4,750 m.s.n.m en los páramos, mostrando preferencia por bosques húmedos entre los 1,990 y los 2,350 m.s.n.m, llegando a ocupar una área de 260.000 kilómetros² (Peyton, 1999). El Perú es el país con mayor población de osos de anteojos, teniendo dos tercios de su población, convirtiéndolo en una especie importante para nuestros andes (Peyton et al. 1998).

El rol de esta especie es vital en los ecosistemas que habita debido a sus funciones de polinizador a través de pelaje, dispersor de semillas por las heces, también ayuda al crecimiento de la vegetación en las partes bajas del bosque gracias a que crea agujeros en las partes altas del bosque al hacer sus nidos favoreciendo el ingreso los rayos solares (Maravi, *et al.*, 2003). Asimismo es considerada un especie focal ya que su conservación asegura la sobrevivencia de los bosques y de otros animales que habiten en esté. (Maravi, *et al.*, 2003).

La población del oso de anteojos está disminuyendo rápidamente, quedando en el Perú según el último censo 2000 osos (Orejuela y Jorgenson, 1996). Sin embargo, Peyton (1999) sugiere que hay más especímenes, por lo que su número aún es incierto. Entre los factores más resaltantes que amenazan con la conservación de esta especie se puede mencionar: la rápida disminución de su hábitad a tasas de 2.4% al año (IUCN, 2011), debido a la ganadería migratoria, incendios forestales, tala de bosques y la fragmentación por colonización. Otras de las razones por la que el oso se ve amenazado es la caza indiscriminada, debido a la creencia de que sus garras tienen propiedades curativas y el tráfico ilícito como mascota de circo (IUCN, 2013). Además en muchas áreas, la

información sobre la situación del oso de anteojos no está actualizada o simplemente no existe, haciendo difícil desarrollar planes adecuados para la conservación de esta especie (IUCN, 2013).

Una dificultad para el estudio de esta especie se debe a que su avistamiento en vida libre es escaso (Castellanos, 2000), por tal motivo se deben utilizar rastros indirectos como sus heces que es un material orgánico que es encontrados en vida libre (Peyton, 1980). Estas muestras pueden ser sometidas a pruebas moleculares debido a que contienen células exfoliadas del colon de las que se puede extraer material genético. (Maturrano, 2012)

Sin embargo, no existe en la actualidad una técnica desarrollada para analizar muestras de heces del oso de anteojos que permita obtener ADN de calidad y cantidad que permita realizar análisis moleculares, como la determinación del sexo. Es por ello que el objetivo principal del presente estudio fue acondicionar una prueba molecular que permita sexar al oso de anteojos utilizando ADN extraído de muestras de heces mediante PCR. Para ello se evaluarán parámetros de temperatura y concentración de ADN y se usarán dos genes como candidatos a marcador genético para el sexado de osos.

Contar con esta técnica podría permitir en el futuro determinar la proporción hembras/machos en animales de vida libre, estimar el número de animales en una determinada región, así como la estructura y/o dinámica de una población (Maturrano, 2012). Toda esta información puede ser usada con fines de desarrollar mejores estrategias de conservación, reintroducción de animales según el sexo conveniente, entre otros. (Griffiths ,1995)

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1. Descripción general de la especie

2.1.2 Generalidades y taxonomía

El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) es una de las ocho especies de osos que existen en el mundo (Figura 1). Es considerado el carnívoro más grande de Sudamérica y el mamífero de mayor tamaño después del tapir (*Tapirus sp.*) (The Bear Den, 1997) haciéndolo una especie focal e importante en su hábitat. (Peyton, 1999) Además es el único representante viviente de la subfamilia Tremarctinae (Stuchi *et al.*, 2001), clasificándose de la siguiente manera:

- Clase: Mammalia
- Orden: Carnivora
- Suborden: Fissipedia
- Familia: Ursidae
- Subfamilia: Tremarctinae
- Género: *Tremarctos*
- Especie: *Tremarctos Ornatus* (Cuvier 1825)



Figura 1: Tipos de osos en el mundo.

2.1.2 Características físicas

El oso de anteojos es reconocido como el carnívoro más grande de Sudamérica (The Bear Den, 1997), un macho adulto llega a medir entre 1,8 y 2 m. y pesar entre 140 a 200 kg. mientras las hembras son aproximadamente las dos terceras partes del tamaño de los machos (Cuesta, 2005). Es el único ‘oso de cara corta’ y poseedor de manchas blanco amarillentas de forma circular alrededor de sus ojos, lo cual lo hace conocido como el oso de anteojos. Estas marcas que a menudo se extienden hasta la garganta y área del pecho varían enormemente entre los individuos consideradas como huellas digitales (figura 2) (Peyton, 1999). El pelaje es usualmente negro pero puede tener una coloración café rojiza oscura. (Roth, 1964).

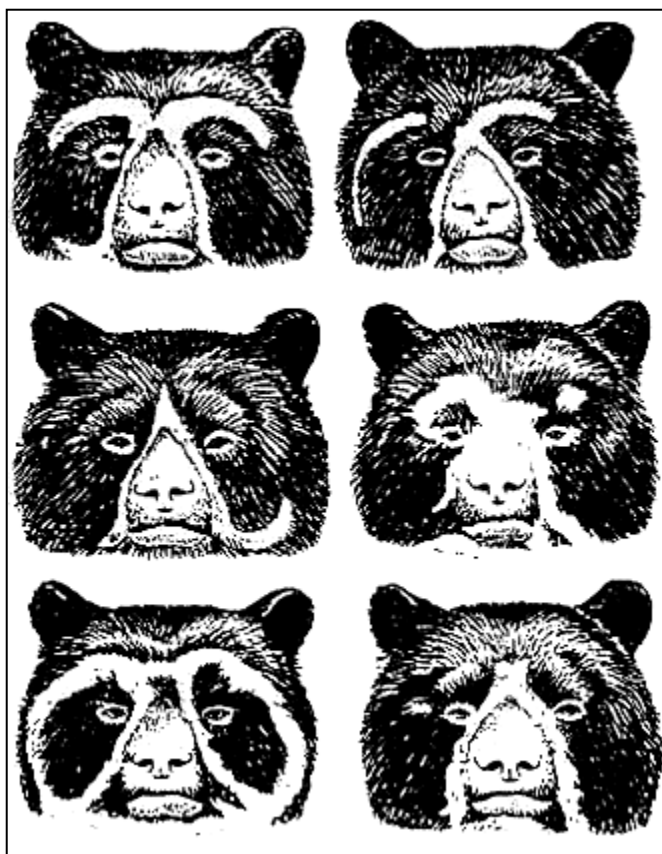


Figura 2: Disposición de manchas amarillentas en la cabeza del oso de antejo.

Entre los úrsido el oso de anteojos posee el musculo zigomaticomandibula más grande lo cual le permite moler alimentos fibrosos duros, asegurando así su nicho contra competidores (Davis, 1955). Para la obtención de estos productos el oso de anteojos tiene que trepar a partes altas de los arboles, esto lo logra debido a que sus patas delanteras son más largas que las traseras además poseen 5 dedos provistos de garras curvas y aplastadas lateralmente (Peyton, 1999). A estas características se le suma que al igual que todos los osos es plantígrado permitiendo mejor estabilidad (Peyton, 1980).

2.1.3 Distribución geográfica

Se distribuye en la región andino amazónica de América del Sur. Ocupando los territorios de Venezuela, Panamá, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y la zona norte de Argentina, en ambas vertientes de la Cordillera de los Andes (Figura 3), habita en ecosistemas ubicados desde los 250 m.s.n.m. en el desierto costero y hasta los 4,750 m.s.n.m. en los páramos, mostrando preferencia por bosques húmedos entre los 1,990 y los 2,350 m.s.n.m. (Peyton, 1999). En el Perú se estima una población de 2000 individuos, la cual es considerada posiblemente la mayor del mundo (Orejuela y Jorgenson, 1996), sin embargo Peyton en 1999 sugiere que hay más especímenes, por lo que no se conoce número de osos. En el Perú se encuentran específicamente en las áreas de ceja de selva de Puno, Cusco, Apurímac, Ayacucho, Junín, Pasco, Huánuco, San Martín, Amazonas y Cajamarca; así como áreas boscosas de Piura, Lambayeque, La Libertad y Ancash (Grimwood, 1969), siendo considerado Puno el punto más austral en habitaría el oso de anteojos en el Perú. (Márquez *et al*, 2010).



Figura 3: Distribución geográfica del oso de anteojos.

Fuente: UICN, 2013

2.1.4 Alimentación

Aunque está clasificado dentro del grupo de los carnívoros, presenta una dieta omnívora, predominando las hierbas y frutos haciéndolo el más herbívoro de todos los osos (Peyton, 1980). Dentro de su dieta se encuentran bromelias (Figura 4), frutos de ericáceas, pseudobulbos de orquídeas, maíz, frutos de achupayas, sauce, tuna, entre otras; además de

insectos y eventualmente lagartijas, aves y mamíferos y a veces insectos y animales pequeños que le sirven de fuente de proteínas (Yerena, 1994).



Figura 4: Oso de anteojos alimentándose de bromelias en bosque húmedo.

Fuente: “Grupo La República Publicaciones S.A” (2008)

2.1.5 Comportamiento

Existen muy pocos estudios sobre el comportamiento en el oso de anteojos, ya que es muy difícil su avistamiento en vida libre (Castellanos, 2000). Pero se sabe que suelen ser diurnos y ocasionalmente nocturnos (Peyton, 1999), por lo general son solitarios juntándose sólo en épocas reproductivas, aunque hay reportes de campesinos que han visto grupos de hasta 9 osos alimentándose (Peyton, 1980) Durante el día pasan horas en las partes altas de

los árboles alimentándose, descansando (Figura 5) y construyendo sus nidos (Figura 6) valiéndose de ramas y hojas donde puede descansar y alimentarse (Tate, 1931; Peyton, 1987). No existe evidencia de que los osos de anteojos hibernen (Peyton 1999).



Figura 5: Osezno de oso de anteojos descansando durante el día en la reserva de Chaparrí, Lambayeque-Perú.

Fuente: Diario “El comercio” (2009)



Figura 6: Oso de anteojos descansando en un nido elaborado por él.

Fuente: © WWF-Canon, Edward Parker

2.2 Estado De Conservación

2.2.1 Importancia del oso en el medio ambiente

Los argumentos para mantener las poblaciones de oso de anteojos son aplicables a todas las especies de osos (Peyton, 1999); entre las más importantes para los pobladores andinos están:

2.2.1.1 Mantenimiento de Cuencas Hidrográficas:

Se sabe que entre la mitad y los tres cuartos de la población andina viven alrededor de las cuencas hidrográficas. Siendo esta también el área donde vive el oso de anteojos. Esta área es de vital importancia para el sustento de la población andina y de los alrededores ya que es fuente de agua para los campos de cultivo, agua potable entre otros. La destrucción de las cuencas hidrográficas ocasionaría serios problemas sociales ya que habría una disminución de alimentos y de fuentes de energía hidroeléctrica llevando a la población a la anarquía y desorden por tales razones se recomienda la protección de estas áreas donde vive el oso. (González, 1991)

2.2.1.2 Beneficios para la biodiversidad:

El oso de anteojos está calificado como especie focal para la biodiversidad en los Andes y en el mundo (Peyton, 1999). Su distribución en los Andes Orientales que va desde Venezuela hasta Bolivia, comprende el 3.2% del territorio sudamericano pero contiene el 76% de las especies de mamíferos del continente (Mares, 1992). El endemismo local es usualmente alto conteniendo el 63% de los mamíferos endémicos de Sudamérica (Mares, 1992). Asimismo las plantas leñosas endémicas comprenden cerca del 20% de la riqueza florística encontrada en estas islas de hábitat (Gentry, 1986). El bosque de niebla que habita el oso de anteojos en los andes orientales del Perú contiene el 32% de las aves, mamíferos y anuros endémicos: (Peyton, 1999). La proporción del número de especies endémicas por unidad de área es aproximadamente 5.75 veces más grande en estos bosques de niebla que lo que es en la selva amazónica del Perú (Leo, 1993). Las unidades de conservación existentes contienen solo una fracción de la biodiversidad andina. Además el oso de anteojos se considera en dispersor de las semillas permitiendo que haya una dinámica en la regeneración de especies vegetales y estructuración de bosque (Peytón 1980). Se especula que la tasa de germinación de las semillas puede ser mayor después que éstas han pasado a través de tracto digestivo de el oso (Young, 1992). Otra función es de polinizador debido a que transportan polen de varias plantas en su espeso pelaje. (Maravi, *et al.* ,2003) (Figura

7). Además ayuda al crecimiento de vegetación en las partes bajas del bosque gracias a que crea agujeros en las partes altas del bosque al hacer sus nidos, favoreciendo así el ingreso los rayos solares (Maravi, *et al.* ,2003). Asimismo es considerada un especie focal ya que su conservación asegura la sobrevivencia de los bosques y de otros animales que habiten en esté. (Maravi, *et al.* ,2003). Así que su conservación brinda equilibrio y armonía a la flora y fauna de su hábitat.



Figura 7: Oso de anteojos desplazándose, cumple función de polinizador a través de su pelaje. Parque Arqueológico y ecológico de Batan Grande-Ferreñafe,
Fuente: Musuk Nolte – diario “El Comercio” (2011)

2.2.2 Estatus de la especie y Amenazas

El oso de anteojos fue catalogado como vulnerable en 1996 en el libro Rojo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (UICN, 2012) (Figura 8). Asimismo en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) lo cual impide su cacería (CITES, 2012); en el Perú la Ley Forestal y de Fauna Silvestre (Decreto de Ley N° 21147, 1975) prohíbe su cacería.

Dentro de las principales amenazas están la fragmentación de su hábitat, cacería y falta de conocimiento de su distribución y estado (UICN, 2013). Gran parte del territorio del oso de anteojos ha sido fragmentado por actividades humanas como la minería, explotación de hidrocarburos, tráfico de tierras, ampliación de carreteras, expansión de áreas agrícolas (Figura 9), contaminación de agua y suelo, deforestación. (UICN, 2013) Todas estas actividades disminuyen el hábitat de los osos aproximadamente entre 300 a 500 Km² cada año (UICN, 2013)

Al igual la cacería furtiva amenaza seriamente al oso, esta se debe principalmente por ser considerados destructores de cultivos de maíz o por haber atacado supuestamente a ganado vacuno (Castellanos, 2002). Además partes del cuerpo del oso de anteojos tales como garras, dientes y vesículas biliares, son usadas en la medicina tradicional nacional y oriental donde son exportadas para suplir la demanda (UICN, 2013). También son considerados como una fuente de comida ya que los pobladores los cazan para comérselos (Figura 10) (Peyton, 1999).

A todo este conflicto se le suma la escasez de conocimiento acerca de la distribución y el estado de los osos (UICN, 2013). En muchas áreas, la información sobre la situación de los osos andinos no está actualizada o simplemente no existen creando gran controversia. (UICN, 2013)

Todas estas carencias hacen que no se puedan realizar planes de conservación claros y precisos.



Figura 8: Estatus del oso de anteojos según Libro Rojo de la UICN, 2012

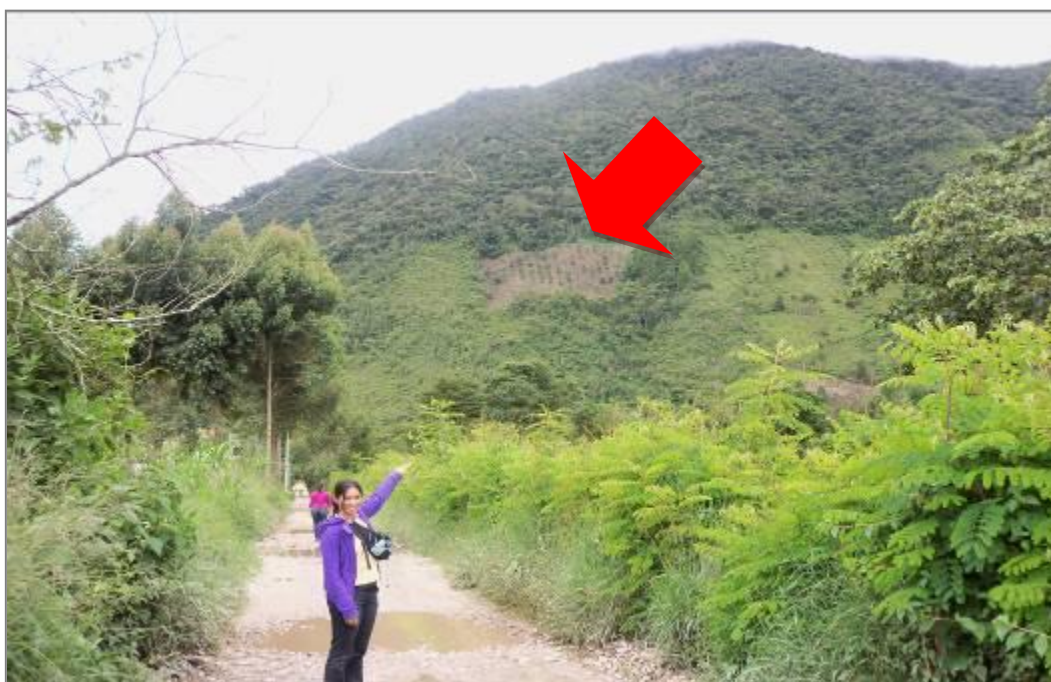


Figura 9: Deforestación por cultivos de granadilla en habitad del oso de antejo, Oxapampa- Perú (2011)

Fuente: Cristina Caselli Schrader



Figura10: Oso andino recién cazado. Su carne sirvió de alimento para el cazador y su familia. Esta fotografía fue tomada en Yanatile a mediados del 2001.

Fuente: GTZ & Asociación Ucumari (2002)

2.2.3 Esfuerzos para su conservación en Perú.

- 3 Las primeras medidas fueron tomadas por Salomón Vilchez Murga y concretadas por Antonio Brack Egg (1961) creando las unidades de conservación en el norte de Perú, seguido a esto Albert Ericsson (1966) publicó un estudio de seis semanas en 1965 donde calculó que había 2,500 osos de anteojos en Perú. Posteriormente Ian Grimwood (1969) volvió a calcular el número de osos en el Perú, dando como resultado un total de 800 y 2,000 osos de anteojos pero no está claro cómo se realizaron estas estimaciones y Peyton (1980) sugiere que el número de osos puede ser mayor. Tras un estudio más extenso, de un periodo de diez años (1977-1987),

describió la ecología básica de la especie, alimentación, el hábitat y aspectos de la calidad del hábitat (Peyton, 1999). Esta información se basó en el examen de las señales de los osos. Desde 1988 hasta el presente, se han hecho incursiones al hábitat de los osos por biólogos peruanos tales como Jessica Amanzo que ha realizado una investigación sobre la distribución del oso de anteojos fuera de las áreas protegidas, mientras Judith Figueroa investigó las poblaciones de osos de anteojos dentro de las áreas protegidas. Daniel Ascencios ha evaluado el estado de conservación del oso de anteojos en el Parque Nacional Río Abiseo y su zona de amortiguamiento (Maravi et al., 2003). Heinz Plenge y Bernia Peytón (1999) han estado trabajando juntos para manejar y llevar a cabo una investigación biológica detallada dentro de la poblaciones de oso de anteojos de los alrededores de la primera área protegido privada del Perú, Chaparrí (Figura 11) (Maravi et al., 2003). De manera más general, a lo largo del país existe un número de iniciativas de educación ambiental brindadas por el Departamento de Biodiversidad y Fauna del Ex - Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA) (Maravi et al., 2003). Peyton (1980) argumenta que el uso del hábitat del páramo de sub-alpino por parte de los osos depende de la ausencia de humanos y la madurez del árbol y frutos de ericáceas. Actualmente, el oso de anteojos está amenazado en todo su rango de distribución debido a la degradación y transformación de su hábitat. Aunque la distribución del oso de anteojos y su población no es conocida, ni siquiera en las áreas protegidas, es importante que las futuras investigaciones se desarrollen a base de material genético obtenido a partir de muestras no invasivas tales como heces y pelos disperso para obtener una información real y concisa de estado en que se encuentra la especie (UICN, 2013). Entre las principales actividades de manejo se incluye el asegurar el manejo efectivo de aquellas áreas protegidas en donde se encuentra el oso de anteojos, mantener áreas de conectividad entre las poblaciones y realizar programas intensivos de educación ambiental que aseguren el apoyo de la población local para la conservación del oso de anteojos (Maravi et al., 2003).



Figura 11: Área de conservación privada Chaparrí – Lambayeque.
Fuente: Oso andino Historia natural –Figuerola J. y Stucchi M.- 2009

3.2 Determinación de sexo en mamíferos

Las técnicas de determinación de sexo en mamíferos son utilizadas de acuerdo a la especie a la que se apliquen, a la edad o estadio en la que esta se encuentre y a la información y/o muestras que se tengan. (Vanya, 2008)

En humanos la determinación del sexo se utiliza en ciencias como la arqueología, antropología y medicina forense como parte de la identificación del individuo del que proviene la muestra (huesos, restos de huesos y tejidos generalmente) (Izaguirre *et al.*, 2001). En medicina también forma parte de diagnósticos genéticos preimplantacionales y evita que se transfieran embriones que puedan tener enfermedades ligadas al sexo, (Coonen *et al.*, 1998; Harper y Bui, 2002).

En mamíferos también se utilizan pruebas de determinación de sexo como parte de la identificación de especies o individuos en investigaciones arqueológicas, forenses (Malisa *et al.*, 2005; Hattori *et al.*, 2003).

En animales domésticos las técnicas de determinación de sexo desarrolladas se aplican principalmente en embriones (Whyte *et al.*, 2007), con el fin de incrementar la presión de selección animal en programas de transferencia de embriones en estadios preimplantacionales (Thibier y Nimbart, 1995). Así en animales de producción, esta prueba forma parte de la selección de individuos asistida por marcadores (MAS- siglas en inglés de Marker Assisted Selection) (Georges, 1999; Virta *et al.*, 2002) y contribuye a acelerar el mejoramiento genético acortando el intervalo generacional, mediante el incremento de crías del sexo deseado y el uso eficiente de vientres (López y Vásquez, 2004). A su vez, al alterar la proporción de los sexos, contribuye a incrementar la efectividad de las pruebas de pro genie, así como la eficiencia de los programas de ovulación múltiple y transferencia de embriones, y producción de embriones *in vitro* (Weigel, 2004). Esta técnica también ha sido aplicada, en menor proporción, para determinar dimorfismo sexual embrionario, para investigar la influencia de ciertos factores ambientales en la determinación del mismo, o en el porcentaje de hembras y machos nacidos en una camada (Grant y Irwin, 2005).

2.3. 1 Determinación de sexo en animales silvestres mediante técnicas invasivas

La determinación del sexo en poblaciones silvestres es esencial para conocer la dinámica y estructura poblacional, el uso del hábitat, el comportamiento, el sistema de apareamiento y para tomar decisiones de manejo de las especies (Brown *et al.*, 1991; Gompper *et al.*, 1998; Hughes 1998; Shaw *et al.*, 2003). Sin embargo, la observación directa de la región anogenital en condiciones naturales es muy difícil si no se capturan los animales (una práctica que resulta muy costosa e invasiva) y sólo ocurre en escasas ocasiones. (Maturrano *et al.*, 2012). Otra forma de asignar el sexo es asumir que existe dimorfismo sexual en la realización de determinados comportamientos, lo que conduce con frecuencia a errores en la asignación del sexo. c. Por último las diferencias de tamaño, tampoco no informan con fiabilidad acerca del sexo de la especie, pues están limitadas por la edad y también por las variaciones interindividuales (Shaw *et al.*, 2003). Por ejemplo en los osos de anteojos los machos son 1/3 más grandes que las hembras, pero es necesario que los ejemplares sean adultos no pudiendo ser evaluadas las crías y juveniles, además el avistamiento en vida libre es poco frecuente, lo cual no es práctico ni útil para la evaluación de la especie. (Figura 12). (Peyton, 1999)



Figura 12: Oso de anteojos en parque zoológico Huachipa. El de la izquierda es macho y la de la derecha es hembra.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012.

3.2.2 Determinación del sexo en animales silvestres mediante técnicas no invasivas

Los métodos no invasivos se han vuelto la elección para el estudio de animales silvestres, pues no requiere de la presencia del animal (Gerloff *et al.*, 1999). Por el contrario, la extracción de ADN de tejidos y sangre requiere generalmente la manipulación previa de los animales para obtener las muestras lo cual es muy difícil en vida libre ya que la captura es ocasional además de causar estrés y hasta muerte de los animales expuestos (Maturrano *et al* 2012).

La implementación de técnicas moleculares capaces de usar ADN extraído de muestras biológicas no invasivas (heces, piel, etc.) se han convertido en alternativas atractivas debido a la exactitud y rapidez de los resultados. (Nardelli *et al*, 2011). Con el advenimiento de las técnicas de biología molecular aparecieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. Esto ha permitido diversos estudios, entre ellos el poder sexar a los animales. El sexaje de animales se han usado en programas de conservación del guepardo africano (*Acinonyx jubatus soemmeringii*) (O'Brien *et al.*, 1983), el sexaje molecular del último guacamayo de Spix (*Cyanopsitta spixii*) en libertad, a partir de una pluma, permitiendo seleccionar a individuos del sexo adecuado para ser liberados como potenciales parejas (Griffiths y Tiwari 1995), Esta metodología se está aplicando con éxito al seguimiento de las poblaciones de los osos pardos (García *et al.* 2003), lince ibérico (Godoy *et al.*, datos sin publicar) y el oso negro de Japón (Yamamoto, *et al.* ,2002)

3.2.2.1.1 Muestras no invasivas como fuente de ADN en mamíferos silvestres

Antiguamente para muchos estudios en animales silvestres era necesaria la captura del animal para poder tomar una muestra, esto producía estrés, cambios de comportamiento y muchas veces hasta la muerte del animal. Gracias al avance de la ciencia ahora es posible extraer ADN de diversas muestras no invasivas como pelos, plumas, heces, orina, cáscaras

de huevo, escamas, tejido blando y duro de animales muertos, especímenes de museo y hasta fósiles.(Maturrano *et al* 2012; Nardelli *et al*, 2011)

Para la extracción de ADN hay que tener en cuenta múltiples factores, principalmente de la muestra (tipo, estado de conservación, cantidad, antigüedad, entre otros). (Nardelli *et al*, 2011). Sin embargo mantienen en general 4 etapas definidas, en la primera ocurre la lisis celular para liberar el ADN, en la segunda se precipitan y extraen proteínas y lípidos, la tercera en la que se precipita el ADN para concentrarlo y la cuarta en la que se rehidrata el ADN ya purificado.

3.2.2.1.2 ADN de muestras de heces

El ADN de esta muestra proviene de células de la mucosa de la pared del colon. (Maturrano *et al* 2012). Debido a que es una muestra expuesta al medio ambiente, contaminada (Figura 13). y con inhibidores de PCR (bilirrubina y sales biliares) (Deuter *et al.*, 1995) el ADN es usualmente de pobre calidad y casi siempre se obtiene en cantidades pequeñas (picogramos) (Nardelli *et al*, 2011) . Este tipo de muestras ha permitido realizar estudios de determinación de especies (Pilot *et al.*, 2007), identificación de individuos, análisis de parentesco, variabilidad genética y filogeografía en numerosas especies (Duriez *et al.*, 2007; Centrón *et al.*, 2008; Cossíos *et al.*, 2009;), así como también sexado de diferentes especies (Yamamoto *et al.*, 2002; Maturrano *et al* 2012).



Figura13: Recolección de heces en campo.

Fuente: García, 2003

3.2.2.1.3 ADN de muestras de pelos

Al igual que en heces el animal no tiene que ser capturado, pero si es necesario la colocación de almbres de púas (Figura 14) en su habitat lo cual genera desorientación, laceraciones con posibles infecciones del area y hasta entrada de microorganismos (Garcia *et al.*, 2003). Además de incentivar a la caseria y requiere un número elevado de personas vigilando las trampas para evitar contaminaciones (Garci *et al.*a, 2003). En el caso de los pelos, el ADN se extrae de las células epiteliales que quedan adheridas a la raíz del pelo al

ser este arrancado (Nardelli *et al.*, 2011). Al difrencias de las heces los pelos resultan ser muestras mas confliables y con mayor concentracion de ADN (Nardelli *et al.*, 2011).

El ADN amplificado partir de muestras de pelo ha sido utilizado para establecer relaciones de paternidad (Field *et al.*, 1998; Goossens *et al.*, 1998), para estudios filogeográficos (Goossens *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007), como fundamento para estudios de captura-recaptura a gran escala, para estimar el tamaño poblacional (Frantz *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2009) o establecer el rango de hábitat de los individuos (Anderson *et al.*, 2006) y para la determinación del sexo (Pilgrim *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2006; Huck *et al.*, 2008).



Figura 14: Recolección de pelos de trampas de púas colocadas en campo.

Fuente: García, 2003.

3.2.2.2 Técnicas moleculares para la determinación de sexo en animales silvestres

3.2.2.2.1 Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Los RFLP se definen como el polimorfismo observado en la longitud de los fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena de ADN (Nubia E. *et al.*, 2009). Esta metodología brinda la posibilidad de comparar los perfiles de bandas generados después de la digestión por enzimas de restricción de las moléculas de ADN de individuos diferentes (Nubia E. *et al.*, 2009). Las bandas son generadas por la hibridación de fragmentos de ADN con secuencias homólogas de DNA radiomarcadas (Nubia E. *et al.*, 2009). Los RFLPs permiten detectar las diferencias de sexo porque los cromosomas sexuales en este caso tienen patrones de asociación con la sonda radiactiva (Figura 15). Dentro de las limitaciones está técnica esta el costo y el tiempo ya que es difícil encontrar enzimas de restricción además estas son diferentes entre especies, otra limitación manipulación de material radiactivo para su visualización (Ferrerira y Grattpaglia, 1998). Esta metodología ha sido usada con éxito por Dvorák *et al.*, 1992, quién logró identificar la sonda pMg1 que detecta RFLPs ligados al sexo en Gallináceas y otras especies de aves.

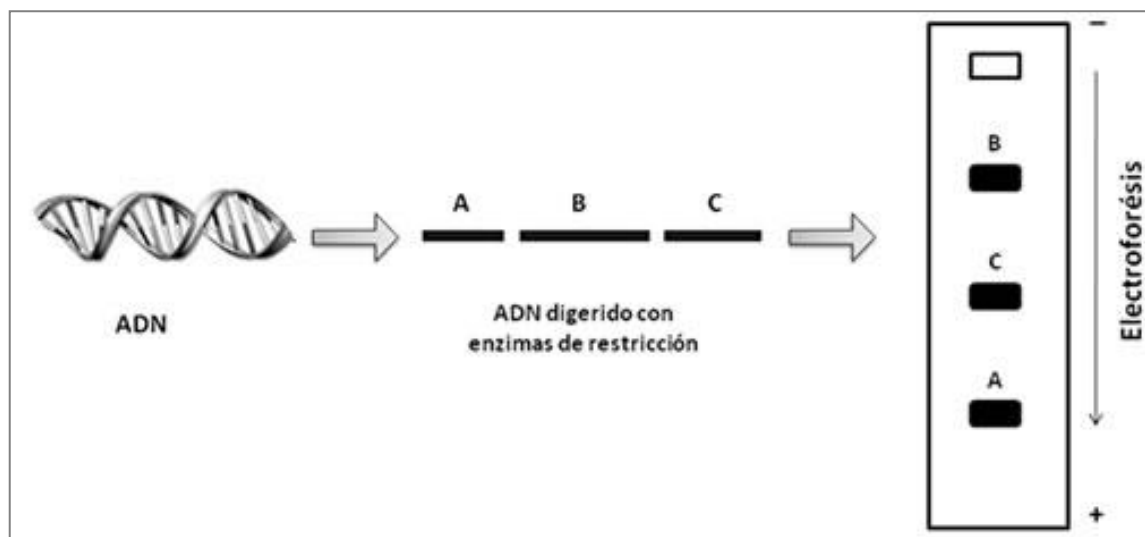


Figura 15: representación esquemática del principio genético: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

3.2.2.2 Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

Esta técnica emplea *primers* cortos (10 nucleótidos) de secuencia arbitraria, que permiten realizar la amplificación sin la necesidad de conocer las secuencias blanco de nucleótidos (Nubia E. *et al.*, 2009). Es una técnica simple y de bajo costo (Welsh y McClelland, 1990). El empleo de esta técnica ha permitido generar huellas genéticas reproducibles que facilitan la identificación del sexo, a su vez esta técnica se emplea para identificar nuevos marcadores sexuales (Chean-Ping *et al.*, 2007). Sin embargo, esta técnica tiene baja reproducibilidad debido a las condiciones de reacción y/o competencia entre el DNA de diferentes fragmentos, que hace que aparezcan bandas inespecíficas más débiles (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996). Además, mutaciones en el sitio de unión del *primer* puede ocasionar la aparición de alelos nulos llevando a errores en la identificación (Lessells y Mateman, 1998). (Figura 16)

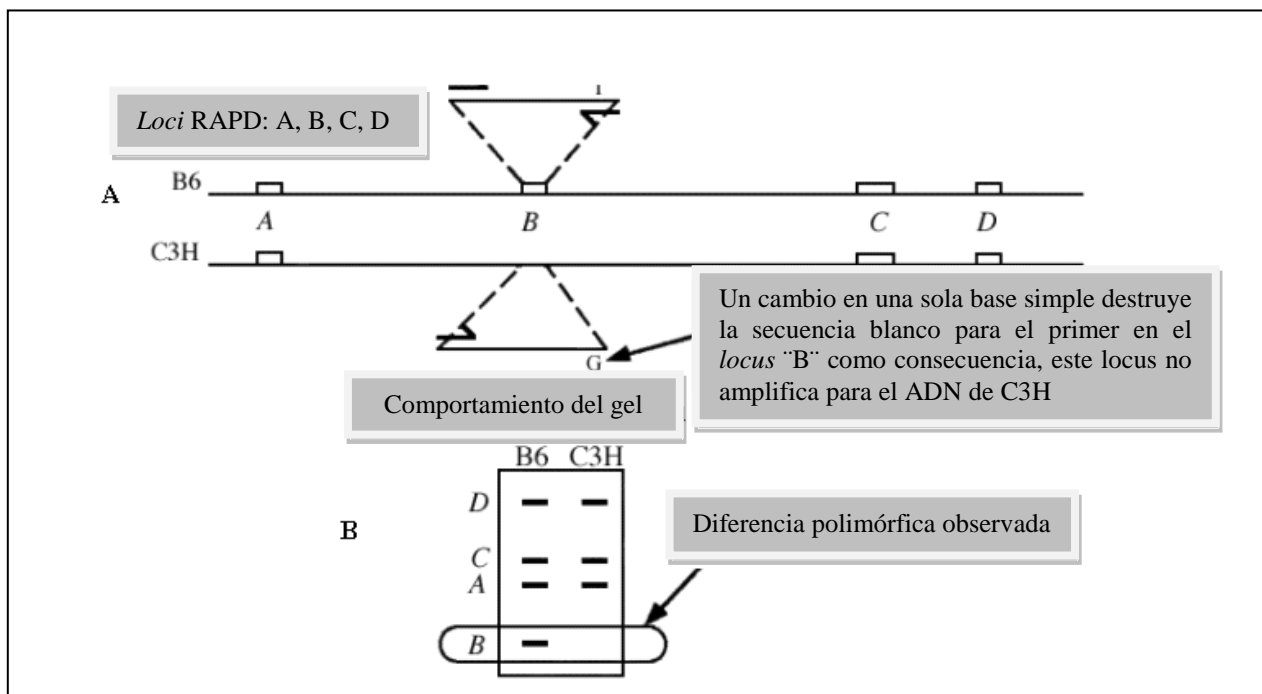


Figura16: Representación esquemática del principio genético: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)

3.2.2.2.3 Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)

PCR son las siglas en ingles de *Polymerase Chain Reaction* o Reaccion en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN (Appa Rao *et al.*, 1994).

Para la realización de está mezclamos en un tubo todos los ingredientes necesarios para hacerlo: (1) una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79°C a 85°C), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa. (Grunenwald, 2003), (2) el ADN del organismo que queremos estudiar donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar, (3) los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleotidos (dNTPs), y brindamos las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa). (Brown, 2000).

Posterior la mezcla de todos estos reactivos en un tubo es colocado en el termociclador donde será sometido a tres fases:

- **Desnaturalización:** En esta etapa se separan las cadenas dobles de ADN a temperaturas de 92 °C a 95 °C.
- **Alineamiento:** Aquí se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrogeno entre los oligonucleótidos y el ADN, alineándose los primer a la cadena de ADN que contiene su secuencia complementaria quedando los oligonucleótidos “alineados”. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5’ a 3’. La temperatura depende de los primers, pero esta varía entre 50 y 70 °C.
- **Extensión:** Es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los

oligonucleótidos que ya se habían alineado. Esto ocurre a temperaturas de 72 a 74 °C. (Figura 17)

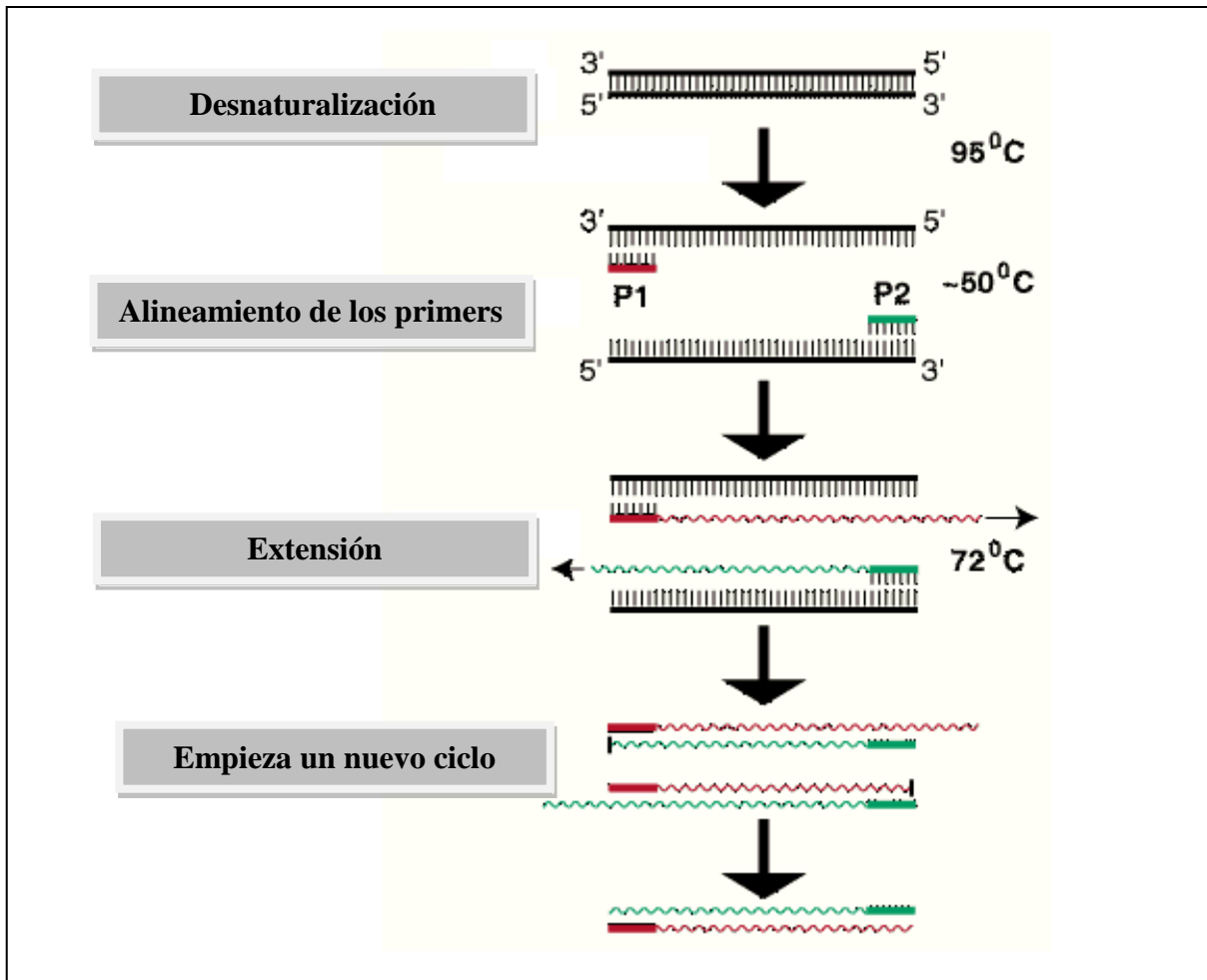


Figura 17: Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción.

2.3.2.3 Marcadores Moleculares más usados para sexado

2.3.2.3.1 Gen SRY

El gen SRY (sex determining región del cromosoma Y) es específico para mamíferos machos (García *et al.*, 2003). Este se encarga del desarrollo de los testículos y la

aparición de los caracteres secundarios masculinos como consecuencia de la acción de los productos hormonales inducidos por estos (García *et al.*, 2003). Los mapas genéticos realizados sobre hembras fenotípicas y con genotipo XY había permitido localizar sobre el brazo corto del cromosoma Y una región que podía portar el TDF (testis determining factor) posteriormente se identificó una región de 35 kb a la que se denominó SRY (Gubbay, 1900) que codificaba para una proteína específica en machos (Figura 18). Además se encontraron proteínas homólogas en todos los mamíferos euterio analizados (García *et al.*, 2003). El descubrimiento definitivo para conocer el papel de este gen se hizo al encontrar que la supresión de 4 de sus nucleótidos ocasionaba un cambio de lectura provocando hembras fenotípicas con genotipo XY. El gen SRY es el responsable de la iniciación de la cascada de expresiones en el tejido gonadal del feto que hace que se comiencen a formar los testículos (Koopman *et al.*, 1990). El gen SRY es una secuencia altamente conservada en mamíferos (Coriat *et al.*, 1993). Cuando el gen SRY se amplifica sobre el gel de agarosa aparece una única banda (168pb) y el individuo queda sexado como macho (García *et al.*, 2003). Es decir, si el individuo analizado es hembra no aparece ninguna banda, esto supone un problema puesto que crea dudas si que todas las muestras analizadas fueran hembras. (García *et al.*, 2003).

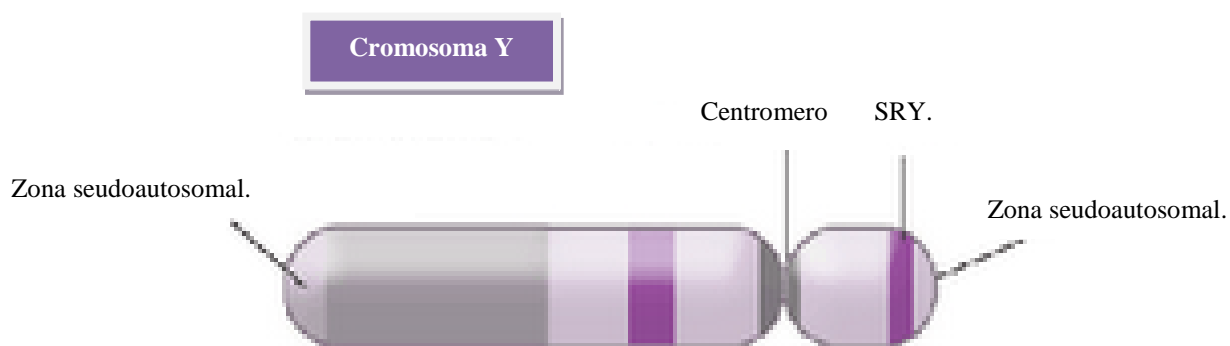


Figura 18: Ubicación del gen SRY en cromosoma Y

2.3.2.3.2 Gen Amelogenina

Amelogenina es un constituyente principal de proteínas de la matriz del esmalte dentario en desarrollo (Lasgerstrom, 1990). Esta proteína está ahora bien caracterizada a partir de los datos de secuencias de aminoácidos que han demostrado estar en un alto grado de homología entre todas las especies investigadas hasta la fecha (Yamamoto *et al* ,2002). Este gen se encuentra en ambos cromosomas X e Y casi en todos los mamíferos, en los ratones solo se encuentra en el cromosoma X (Chapman, 1991) y en monotremas y marsupiales se encuentra y también en los cromosomas autosómicos (Watson, 1992). El análisis simultáneo de estos dos genes es de gran utilidad en la identificación del sexo debido a que genera productos de amplificación del cromosoma X e Y, gracias a la amplificación de ambas regiones en un mismo tubo de reacción, el gen de la amelogenina ofrece la ventaja de tener al cromosoma X como control interno que siempre debe amplificar (Yamamoto *et al* ,2002). Lo que ha convertido a esta prueba en la preferida y más confiable en el análisis del sexo en diferentes especies.

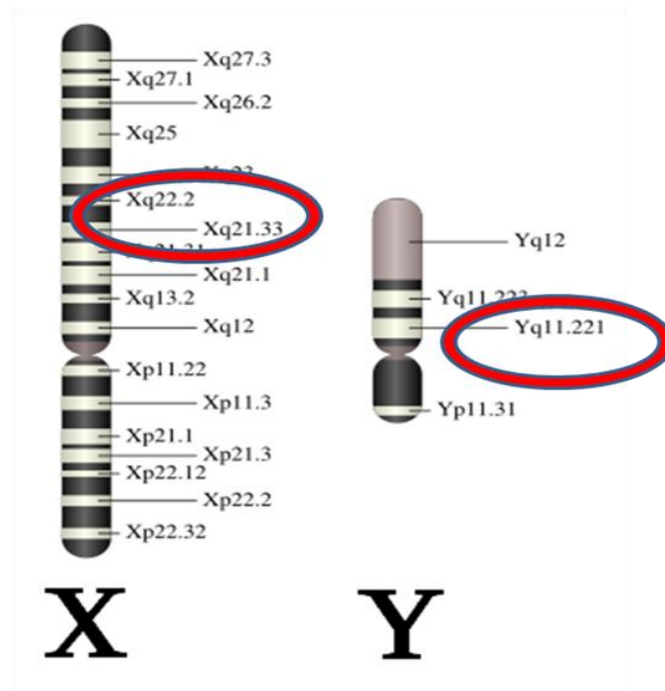


Figura 19: Ubicación del gen Amelogenina en cromosoma X e Y

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Animales de estudio

Las muestras fueron tomadas de tres zoológicos y un zoo criadero: (1) el zoo criadero del colegio la Inmaculada (n=2) ubicado en el distrito de Surco provincia de Lima, (2) Parque zoológico de Huancayo- CRCLL (n=3) ubicado en el cerro de La Libertad, Huancayo, (3) Zoológico del Parque De Las Leyendas- (n=6) ubicado en el distrito de San Miguel y (4) Parque Zoológico Huachipa (n=6) ubicado en el distrito de Ate; los dos últimos ubicados en la provincia de Lima (Figura 20).

En total fueron muestreados 17 osos (*Tremarctos ornatus*) de los cuales 10 eran hembras y 7 eran machos (Figura 21). Los datos de cada uno de los animales muestreados se muestran en el cuadro N° 1.



Figura 20: Lugares de colecta de muestras.

Cuadro 1: Identificación de los osos de anteojos muestreados.

Código	Identificación	Procedencia	Sexo fenotípico
UBM1	Tuky	Colg. Imaculada	Hembra
UBM2	Cindy	Colg. Imaculada	Hembra
UBM3	Wini	Huancayo- CRCLL	Hembra
UBM4	Luna	Huancayo- CRCLL	Hembra
UBM5	Susy	Parq. Leyendas	Hembra
UBM6	Estrella	Parq. Leyendas	Hembra
UBM7	Candy	Parq. Leyendas	Hembra
UBM8	Luna	Parq. Leyendas	Hembra
UBM9	Hannah	Huachipa	Hembra
UBM10	Pessy	Huachipa	Hembra
UBM11	Canco	Huancayo- CRCLL	Macho
UBM12	Bubu	Parq. Leyendas	Macho
UBM13	Yogui	Parq. Leyendas	Macho
UBM14	Hujo	Huachipa	Macho
UBM15	Puky	Huachipa	Macho
UBM16	Yogui	Huachipa	Macho
UBM17	Angus	Huachipa	Macho



Figura 21: Osos de anteojos muestreados. A: ejemplar macho: Yogui. B: ejemplar macho: Hujo. C: ejemplar hembra: Luna. D: el del fondo es macho: Bubu, y la otra es hembra: Cindy. Las fotos A, C, D pertenecen al parque de las leyendas. La foto B pertenece al Zoológico Huachipa.

Fuente: Cristina Caselli Schrader. 2012.

3.1.2 Lugar de estudio

Las muestras fueron almacenadas directamente en el lugar de colecta preservándolas en frascos de 100 ml. con etanol absoluto, luego fueron procesadas en la Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), Lima. Todas las muestras que se usaron tuvieron un máximo de un mes de conservación.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Colección y conservación de muestras no invasivas

Las muestras se obtuvieron directamente de los corrales o de los ambientes externos, en este último fue necesario observar a los animales individualmente hasta que defecaran para identificar a que animal pertenecía y así saber el sexo de la muestra. Para evitar contaminaciones, se utilizó, mascarillas, lentes, gorros protectores, guantes desechables, bisturís y espátulas estériles estos tres últimos eran cambiados por cada muestra. Una vez identificadas las muestras fueron colocadas en frascos de plástico estériles de boca ancha de 100 ml. y cubiertas con etanol absoluto, se rotularon con el sexo, nombre, ubicación y fecha de colecta (Figura 22). Dentro de las muestras hubo heces de diferentes consistencias como semilíquida, líquida, pastosa y en bloques (Figura 23); todas siguieron el mismo protocolo.



Figura 22: Toma de muestra en zoológico Huachipa.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012

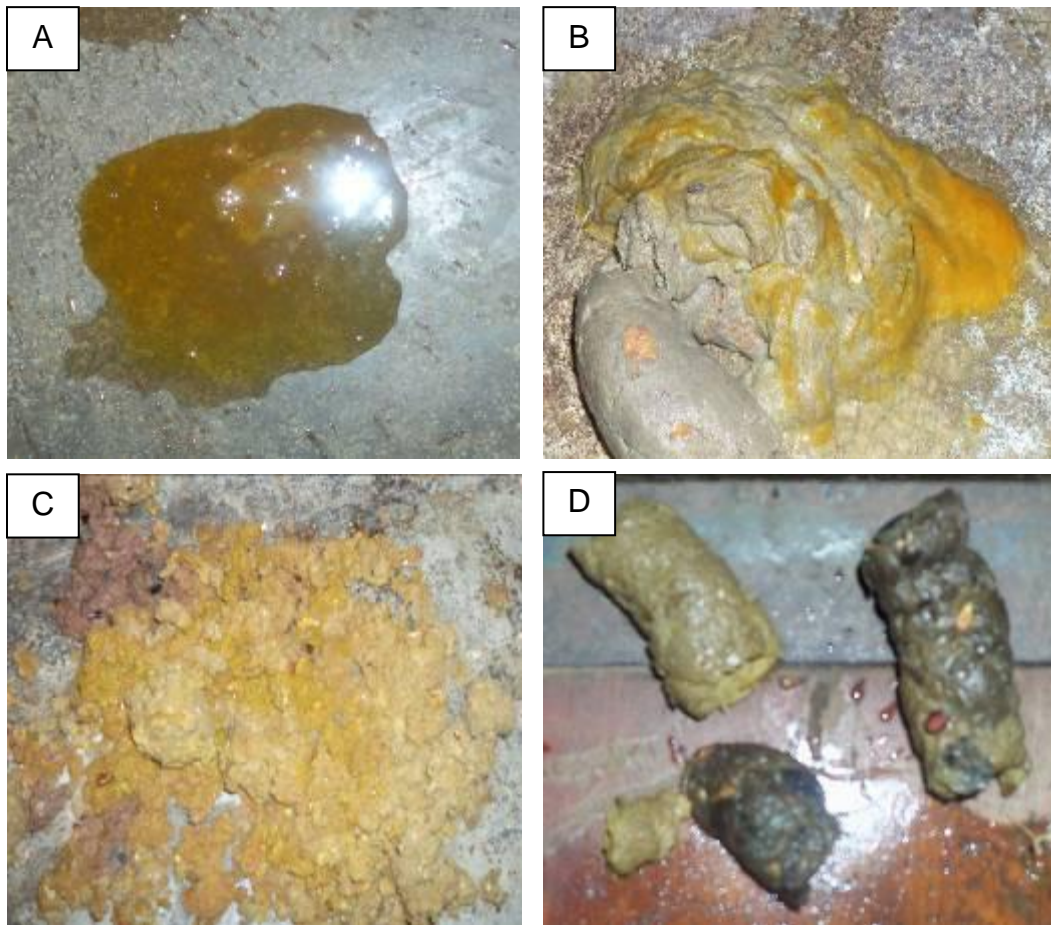


Figura 23: Tipos de heces, A: líquida; B: semilíquida; C: pastosa; D: en bloques.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012.

3.2.2. Transporte de muestras

Una vez colectadas las muestras, fueron transportadas manteniendo una cadena de frío (4°C) para su conservación hasta el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la facultad de Medicina Veterinaria donde fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. (Figura 24)



Figura 24: Materiales para toma de muestra

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012.

3.2.4 Extracción de ADN

El propósito de esto fue el de extraer el ADN de las células del colon del animal, las cuales fueron desprendidas durante la salida de las heces e impregnadas en su superficie de estas. Como paso inicial se tomaron entre 180 y 200 mg de la superficie de las de heces procurando eliminar residuos de alimentos y tomando las áreas más brillosas con una hoja de bisturí (Figura 25). Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit de QIAGEN con una modificación en el protocolo. Dicha modificación consistió en colocar los 200 mg de material fecal extraído con 3-4 ml de buffer de lisado (ASL) y con ayuda de un vortex se agitó de manera constante por 15

minutos durante cuatro días consecutivos (Figura 26). Luego se continuó con el proceso de extracción descrito por el fabricante del kit.

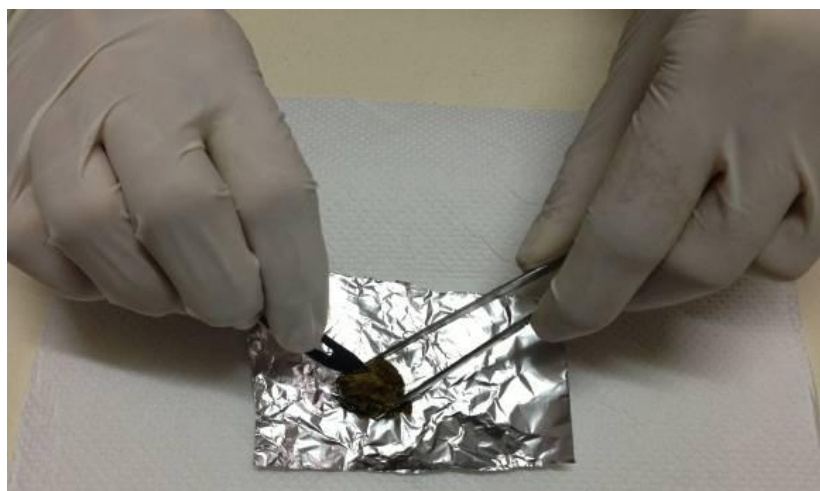


Figura 25: Extracción de ADN de heces de oso de anteojos

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012.

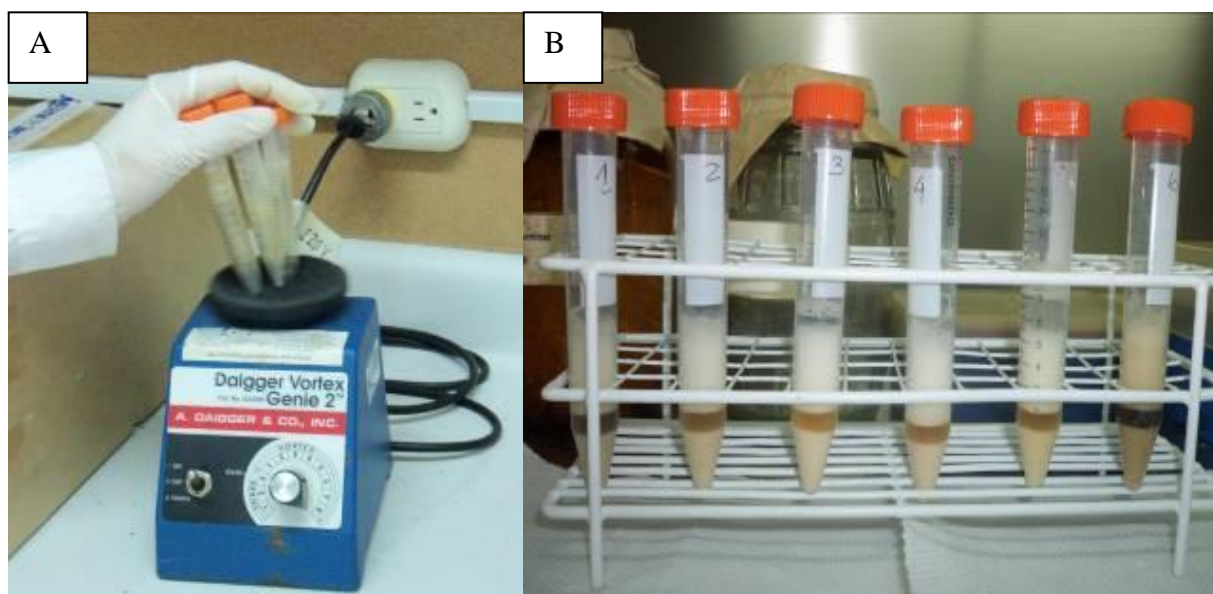


Figura 26: A: Agitando muestras por 15 minutos con ayuda del vortex. B: Lisado material fecal extraído con 3-4 ml de buffer de lisado (ASL) después de 4 días.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012.

3.2.5 Amplificación de ADN mediante PCR

En esta etapa se evaluaron dos genes: el gen amelogenina y el gen SRY.

3.2.4.1 Optimización de la amplificación del gen amelogenina (SE47-SE48)

Se emplearon los primer SE47 Y SE48 para segmentos del gen amelogenina presente en los cromosomas sexuales (X e Y). Estos fueron usados por Yamamoto *et al* (2002) (Cuadro2). Estos genes se amplificaron mediante PCR siguiendo el siguiente protocolo.

Cuadro 2: Secuencia de los Primers SE47 – SE48 usado en el presente estudio

Loci	Referencia	Primer Forward SE47	Primer Reverse SE48	Tamaño Del fragmento
X-Y	Yamamoto <i>et al</i> 2002	5`CAGCCAAACCTCCCTC TGC	5`CCCGCTTGGTCTTGTCTG TTGC	245-191 pb

3.2.4.1.1 Condiciones del PCR

Para el ensayo de la PCR se utilizó el Kit Multiplex (Qiagen), las condiciones de amplificación fueron estandarizadas en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la FMV teniendo un volumen final de 20 µl, conteniendo 10 µl de Master-Mix (Taq, dNTPs), 0.4 µl de cada primer a una concentración de trabajo de 20 pM (cuadro 3).

Cuadro 3: Condiciones del PCR para los primer SE47 – SE48

Mezcla de PCR			Ciclos del PCR		
Reactivos	Concentración	Volumen	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Master - Mix		10 µl	95	9 min.	1
Primer- Se 47	20	0.4 µl	94	30seg.	35
Primer- Se 48	20	0.4 µl	58	30seg.	
Agua		2 µl	72	1 min.	
ADN		7.2 µl	72	5 min.	1
Volumen final		20 µl	4	α	

- MIX : buffer PCR, 3 mM MgCl₂, 500 uM dNTPs c/u

3.2.3.2 Optimización de la amplificación del gen SRY (SRYB3-SRYB5)

Se emplearon los primer SRYB3 y SRYB5 segmentos del gen SRY presente en los cromosoma Y. Este fue usado en diferentes mamíferos por Pomp *et al en* 1995(Cuadro 4). Este gen se amplifico mediante PCR siguiendo el siguiente protocolo.

Cuadro 4: Primer SRYB3 – SRYB5

Loci	Referencia	Primer Forward SRYB3	Primer Reverse SRYB5	Tamaños de fragmento
Y	Pomp <i>et al</i> , 1995	5`GCCAGTAGTCTCTGTGCC TCCT	5`TGAACGCTTTCATTGTGT GGTC	163 pb

3.2.3.2.1 Condiciones del PCR

Para el ensayo de la PCR se utilizó el Kit Multiplex (Qiagen), las condiciones de amplificación fueron estandarizadas en el laboratorio de Biología y Genética Molecular de la FMV teniendo un volumen final de 20 µl con aproximadamente 20 a 30ng ADN, 10 µl de Master - Mix (Taq, dNTPs), 0.4 µl de cada primer a una concentración de trabajo de 20 pM (Cuadro 5).

Cuadro 5: Condiciones del PCR para los primer SRYB3 – SRYB5

Mezcla de PCR			Ciclos del PCR		
Reactivos	Concentración	Volumen	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Master - Mix		10 µl	95	4 min.	1
Primer- SRYB3	20	0.4 µl	95	15seg.	35
Primer- SRYB5	20	0.4 µl	55	45seg.	
Agua		2 µl	72	30 seg.	
ADN		7.2 µl	72	5 min.	1
Volumen final		20 µl	4	α	

- MIX : buffer PCR, 3 mM MgCl₂, 500 uMdNTPs c/u

3.2.5 Electroforesis

Utilizando un sistema de electroforesis horizontal se verificó la correcta amplificación de los productos de PCR, éstos fueron diluidos previamente con *buffer loading* a razón de 5:1 y depositados en un volumen final de 20 µl en un gel de agarosa al 3 % durante 2 horas y 30 minutos a 100 voltios, se utilizó un marcador de 100 bp para

corroborar los tamaños de los alelos (Figura 27). Para ambos genes se usó las mismas condiciones de electroforesis.



Figura 27: Depositando los productos del PCR en el gel de agarosa al 3%.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012

IV. RESULTADOS

4.1 Obtención de ADN de muestras de heces en osos de anteojos

Durante el periodo de estudio se analizaron un total de 17 muestras fecales frescas de las cuales 10 eran de hembras y 7 de machos (Cuadro 1), entre las muestras hubieron algunas con abundante material fibroso como cascara de choclo, restos de camote y otros; también se recolectaron heces semilíquidas y sólidas y de todas se obtuvo una concentración aproximada entre 20 a 30 ng de ADN. En la electroforesis todas las muestras no presentaron bandas definidas de ADN, sino un barrido (ADN degradado), por lo que se estima que el ADN obtenido es de baja calidad (Figura 28).

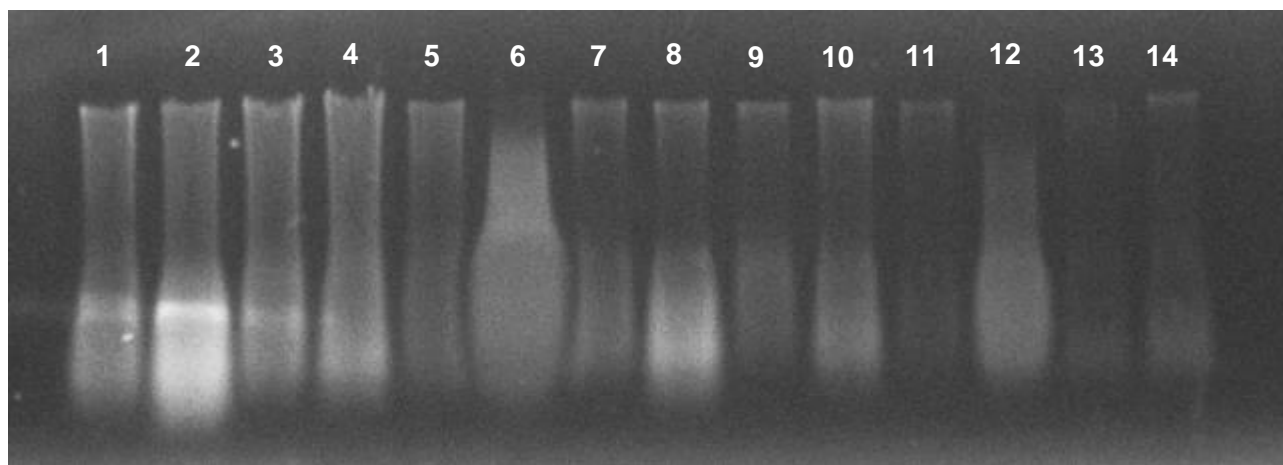


Figura 28: Gel de agarosa al 0.8%. En los pocillos de 1 -14 se muestra la calidad y cantidad de ADN extraído a partir de muestras de heces en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*).

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012

4.2 Obtención de la amplificación del gen Amelogenina con los primer SE47 y SE48 mediante PCR

De las 17 muestras analizadas (10 hembras y 7 machos), se diagnosticó correctamente a todas (100%) (Cuadro 6). En la Figura 29 se muestra el genotipo encontrado para cada muestra, donde para el genotipo hembra una doble banda de 245 pb correspondientes a los cromosomas XX, mientras que en machos se visualizó dos bandas una de 245pb y otra de 191 pb correspondientes a los cromosomas X e Y respectivamente. Se usaron dos controles de ADN humano, uno femenino y uno masculino.

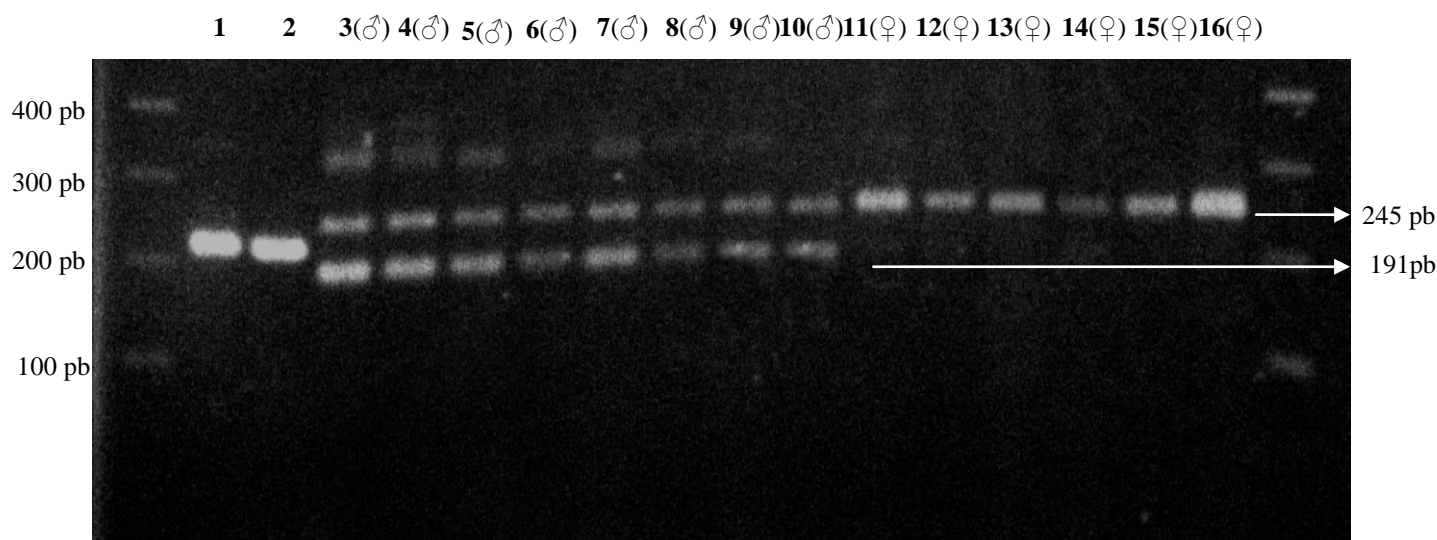


Figura 29: Visualización de productos de PCR en gel de electroforesis al 3%. usando los primer SE47 y SE48 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*). Los pocillos del 3-10 pertenecen a osos machos, los pocillos del 11-16 corresponden a osas hembras. Los pocillos 1 y 2 corresponden controles humanos y a los extremos marcadores de peso molecular de 100 pb.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012

4.3 Obtención de la amplificación del gen SRY con los primers SRYB3 –SRYB5 mediante PCR

De las 17 muestras (10 hembras y 7 machos) analizadas con los primers SRY específicos para este marcador del sexo, no se logró determinar el sexo en ninguna de las muestras evaluadas (0%) (Cuadro 7). Se usó un control de ADN masculino, el cual amplificó una sola banda de 163 pb, respaldando así la prueba (Figura 30).

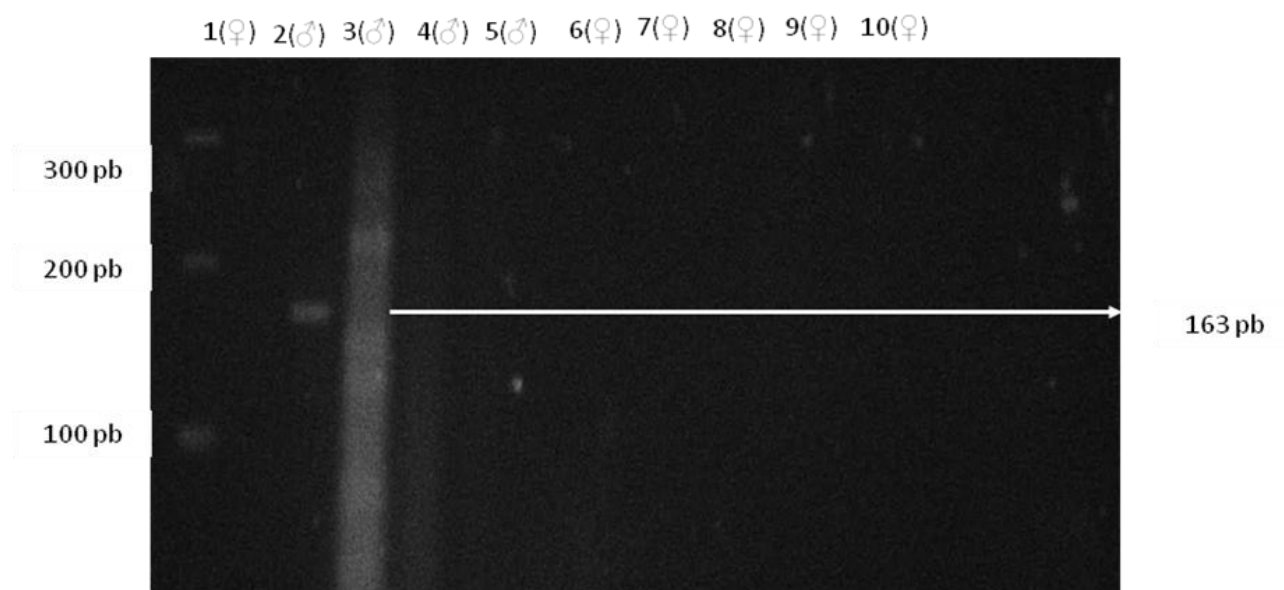


Figura 30: Visualización de productos de PCR en gel de electroforesis al 3%. usando los primer SRYB3 –SRYB5 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*). Los pocillos del 3-5 pertenecen a osos machos, los pocillos del 6–10 corresponden a osas hembras. El pocillo 1: control humano femenino; 2: controle humano masculino amplificó (163pb) y al extremo marcador de peso molecular de 100 pb.

Fuente: Cristina Caselli Schrader, 2012

Cuadro 6: Sexo obtenido por PCR usando los primer SE47- SE48 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*).

				Sexo obtenido por PCR de ADN de heces	
Código	identificación	Procedencia	Sexo conocido	PCR-SE47-SE48	Coincid.
UBM1	Tuky	Colg. Imaculada	Hembra	Hembra	100%
UBM2	Cindy	Colg. Imaculada	Hembra	Hembra	100%
UBM3	Wini	Huancayo-CRCLL	Hembra	Hembra	100%
UBM4	Luna	Huancayo-CRCLL	Hembra	Hembra	100%
UBM5	Susy	Parq. Leyendas	Hembra	Hembra	100%
UBM6	Estrella	Parq. Leyendas	Hembra	Hembra	100%
UBM7	Candy	Parq. Leyendas	Hembra	Hembra	100%
UBM8	Luna	Parq. Leyendas	Hembra	Hembra	100%
UBM9	Hannah	Huachipa	Hembra	Hembra	100%
UBM10	Pessy	Huachipa	Hembra	Hembra	100%
UBM11	Canco	Huancayo-CRCLL	Macho	Macho	100%
UBM12	Bubu	Parq. Leyendas	Hembra	Macho	100%
UBM13	yogui	Parq. Leyendas	Hembra	Macho	100%
UBM14	Hujo	Huachipa	Macho	Macho	100%
UBM15	Puky	Huachipa	Macho	Macho	100%
UBM16	Yogui	Huachipa	Macho	Macho	100%
UBM17	angus	Huachipa	Macho	Macho	100%

Cuadro 7: Sexo obtenido por PCR usando los primer SRYB3- SRYB5 a partir de ADN extraído de heces en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*).

Código	identificación	Procedencia	Sexo conocido	Sexo obtenido por PCR de ADN de heces	
				PCR SRYB3-SRYB5	Coincid.
UBM1	Tuky	Colg. Imaculada	Hembra	No amplificó	0%
UBM2	Cindy	Colg. Imaculada	Hembra	No amplificó	0%
UBM3	Wini	Huancayo-CRCLL	Hembra	No amplificó	0%
UBM4	Luna	Huancayo-CRCLL	Hembra	No amplificó	0%
UBM5	Susy	Parq. Leyendas	Hembra	No amplificó	0%
UBM6	Estrella	Parq. Leyendas	Hembra	No amplificó	0%
UBM7	Candy	Parq. Leyendas	Hembra	No amplificó	0%
UBM8	Luna	Parq. Leyendas	Hembra	No amplificó	0%
UBM9	Hannah	Huachipa	Hembra	No amplificó	0%
UBM10	Pessy	Huachipa	Hembra	No amplificó	0%
UBM11	Canco	Huancayo-CRCLL	Macho	No amplificó	0%
UBM12	Bubu	Parq. Leyendas	Macho	No amplificó	0%
UBM13	yogui	Parq. Leyendas	Macho	No amplificó	0%
UBM14	Hujo	Huachipa	Macho	No amplificó	0%
UBM15	Puky	Huachipa	Macho	No amplificó	0%
UBM16	Yogui	Huachipa	Macho	No amplificó	0%
UBM17	angus	Huachipa	Macho	No amplificó	0%

V. DISCUSIÓN

El empleo de técnicas no invasivas, para caracterizar el sexo de individuos de una población ha aumentado enormemente en los últimos años debido al desarrollo de técnicas cada vez más eficientes para la extracción de ADN a partir de muestras muy pequeñas y degradadas como las heces. Para ello la toma de muestras y conservación de éstas es de vital importancia.

Nuestro objetivo fijado era poder identificar el sexo del oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) a partir de muestras no invasivas como las heces. Los resultados obtenidos muestran claramente que este objetivo ha sido plenamente alcanzado, pudiéndose así contar con una prueba que pueda ser usada en animales de vida libre para brindar información valiosa para la conservación de esta especie y su medio ambiente

Nosotros nos enfrentamos a diferentes consistencias de heces debido a que la dieta varía en cada zoológico; entre los tipos de heces estuvieron las semilíquidas, líquidas, patosas y en bloques (figura 21), todas estas fueron conservadas en etanol absoluto y de las cuales se extrajo ADN sin importar como estuviera la muestra lo cual es importante ya que en vida libre se puede encontrar este tipo de heces y podrá ser usada sin ningún problema. Las muestras conservadas en etanol absoluto mostraron tan igual desempeño que muestras colectadas en frascos con los silicagel utilizados en el estudio del oso pardo (García *et al.*, 2003) disminuyendo así el costo de la prueba además de ser más fácil su adquisición.

En este estudio, la extracción de ADN fue un paso crítico para obtener buenos resultados. Trabajos comparativos han utilizado para pelos dos métodos: Chelex y fenol-cloroformo. El método de Chelex es ampliamente utilizado en la bibliografía (Taberlet y Bouvet, 1994; Gagneux *et al.*, 1997; Taberlet, 1997; Marshall y Ritland, 2002) porque el ADN muestra una preferencia para pegarse al mismo, y por tanto parece en principio más eficiente para muestras con baja calidad de ADN. El tiempo requerido para realizar la extracción del ADN con el método de Chelex es relativamente corto. Sin embargo este método tiene la desventaja de que, una vez extraído, el ADN se conserva mal en el medio y

se degrada más rápidamente que en otros tampones (aproximadamente un año de duración a -20°C) (García *et al.*, 2003). El método fenol-cloroformo, el más común utilizado en trabajos con buena calidad de ADN y se muestra mucho más estable conservándose el ADN durante periodos más largos de tiempo (García *et al.*, 2003). También se ha comprobado que el método de la sílica para extraer ADN a partir de las heces es muy efectivo, obteniéndose porcentajes algo mayores de lo esperado (41.14%) si tenemos en cuenta trabajos similares como el de Taberlet *et al.* (1997) con un 16.2%, Frantzen *et al.* (1998) con un 64%, Rey *et al.* (2000) con un 24.8% o Marshall y Ritland (2002) con un 44.3%. En la actualidad, ciertas casas comerciales están desarrollando nuevos sistemas de extracción de ADN a partir de muestras de mala calidad, como heces y tejidos muy degradados. Este tipo de técnicas se muestra a veces como la única alternativa posible en especies muy amenazadas. Sin embargo, el método a partir de excrementos no es fácil, debido a que el ADN obtenido suele ser escaso y muy fragmentado además de contener restos de plantas. Por este motivo, se realizó una modificación del protocolo en la fase de lisis celular del kit comercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit de QIAGEN, realizado ya anteriormente por Maturrano en el 2012 en heces de vicuñas (*Vicugna vicugna mensalis*). Con esta modificación se extrajo cantidades óptimas de ADN sin necesidad de realizar múltiples réplicas de cada análisis. (Taberlet *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1998).

Otro punto muy importante que se debe tener en cuenta cuando se trabaja con pequeñas cantidades de ADN extraído de las heces es que es muy fácil contaminarlo con ADN de humanos, convirtiendo la colecta y el proceso de extracción en pasos críticos en este estudio. Cuando trabajamos con el gen SRY tuvimos mucho cuidado ya que es imposible determinar la contaminación de humanos debido a que la secuencia es altamente conservada en mamíferos (Coriat *et al.*, 1993). En cambio el gen de la Amelogenina amplifica fragmentos con diferentes longitudes de banda entre humanos y osos convirtiéndolo en el marcador de sexo ideal. Otra desventaja que posee el gen SRY es que es necesario un control interno debido a que sólo amplifica una banda para ejemplares machos pudiendo dar falsos negativos.

Al momento de amplificar los genes en estudio se pudo ver que solo amplifico adecuadamente con el gen de amelogenina permitiendo identificar a hembras de machos adecuadamente. Mientras que con el gen SRY no se pudo lograr este objetivo probablemente por: (1) El tipo de muestra (heces) ya que en estudios anteriores el oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) llevo a ser sexado por ambos genes pero la fuente de ADN eran pelos (Page`s et al., 2009). Se sabe que la extracción de ADN a partir de pelos contiene mayor cantidad de ADN y menos inhibidores de PCR que muestras de heces. (2) la especificidad de los primers para el gen SRY. Cuando se usan muestras tan degradadas como heces la utilización de primer no específicos para la especie suelen no ser fiables ya que es posible que no amplifique (Page`s et al., 2009). (3) También se pensó que la secuencia del gen SRY era diferente para esta especie comparada con los otros osos que si habían logrado ser sexados con el gen SRY pero se descarta ya que en Tarbet en el 2009 secuencia este gen y afirma que la variabilidad genética de este gen entre los diferentes osos es muy baja.

A través del presente trabajo se pudo demostrar que es posible sexar a los osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*) mediante PCR usando el gen de la Amelogenina (SE47 y SE48) a partir de muestras no invasivas como las heces. Estos primers amplificaban dos bandas una de 245 pb y 191 pb; en machos, mientras que en las hembras solo estaba presente la banda de 245 pb. Pudiendo determinar el sexo de 17 ejemplares (10 hembras y 7 machos), el sexo encontrado en esta prueba coincidió en un 100% con el sexo conocido considerándose una prueba confiable para el sexado de oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*). Este resultado se puede contrastar con los hallados por Page`s en el 2009, donde logró sexar a 1 de 2 osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*) machos con el gen de amelogenina a partir de muestras de pelos y tejidos. Este significa que si nosotros pudimos sexar a todos los osos de anteojos machos adecuadamente usando muestras de heces (ADN más degradado que el de pelos y tejidos) podemos afirmar que el proceso de extracción usado por nosotros es altamente efectivo y recomendamos utilizarlo. Se espera que en el futuro esta prueba sea usada en vida libre proporcionando datos de vital importancia para su conservación.

VI. CONCLUSIONES

1. Se logró estandarizar una prueba molecular capaz de sexar al oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) usando el gen Amelogenina (SE47 y SE48) a partir de ADN extraído de heces.
2. Se logró identificar correctamente los 17 osos muestreados (7 machos y 10 hembras). Usando el gen Amelogenina (SE47-SE48)
3. El gen SRY (SRYB3 – SRYB5) no es capaz de determinar el sexo en osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*) a partir de ADN extraído de heces.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda usar esta prueba en osos de vida libre para la obtención de datos vitales que contribuyan a desarrollar estrategias para su conservación.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Anderson HM, Mccafferty DJ, Saccheri IJ, Mc-cluskie AE.2006.** Non-invasive genetic sampling of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) usinghairs. *Hystrix It. J. Mamm.* 17: 65-77.
2. **Appa Rao. K.B.C.; D. Mohan; S.M. Totey. 1994.** Polymerase chain reaction and tts applications: special emphasis on its role in embryo sexing. *Biotechnology Advances* 15: 341-355.
3. **Brack-egg A. 1961.** El oso de anteojos. *Biota* 3:345-350.
4. **Brown MW, Helbig R., Boag PT, Gaskin DE, White BN. 1991.**Sexing belugawhales (*Delphinapterus leucas*) by means of DNA markers. *Canadian Journal of Zoology* 69: 1971-1976.
5. **Brown, T.2000.** The polymerase chain reaction. En: essential molecular biology. A practical approach.. Vol 2. 2 Ed. Oxford University Press. Oxford: 89-120.
6. **Buel E., Wang g GC, Schwartz M. 1995.** Pcr amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used ingender determination. *Journal of Forensic Sciences* 40:641-644.
7. **Castellano Armando. 2000.** Captura de osos andinos (*tremarctos ornatus*) con “trampa iznachi”. Ecuador. Pp. 80
8. **Centrón D, Ramírez B, Fasola L, Macdonald DW, Chehébar C, Schiavini A, Cassini MH. 2008.** Diversity of mtDNA in southern river otter (*Lontra provocax*) from Argentinean Patagonia. *J. Hered.* 99: 198-201.
9. **Chapman VM, Keitz BT, Disteché CM, Lau EC, Snead ML.1991** Linkage of amelogenin (Amel) to the distal portion of the mouse X chromosome. *Genomics* 10:23-28

10. **Chean-Ping W, Yan-Ming H, Rean-Tsz W, Kuo-Tai Y, Mu-Chiou H. 2007.** A novel sex-specific DNA marker in Columbidae birds. *Theriogenology*; 67:328-333.
11. **CITES. 2009.** Lima. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, apéndice I, II y III [INTERNET] [14 abril 2012]. Disponible en [http:// www.cites.org/esp/app/appendices.shtml](http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml).
12. **Coriat A., Müller U., Harry J. 1993.** PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of SRY-Box motif. *PCR Methods and Applications*, 2: 218-222.
13. **Cossíos D, Lucherini M, Ruiz-García M, Angers B .2009.** Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). *Evol. Biol.* 9: 68-81.
14. **Cuesta.2005.** El Oso Andino: Una especie clave para la conservación del páramo y de los bosques andinos. Ed. Abya-Yala. Quito,Ecuador. 71-86 p.
15. **Cuvier F.1825.** Tremarctos ornatus In: *Hist. Nat. Mammifères*. vol 3, pt. 50.
16. **Davis DD. 1955.** Masticatory apparatus in the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*). *Fieldiana:Zoology*, Chicago 37:25–46.
17. **Deuter R S, Pietsch S, Hertel YO, Müller. 1995.** A method for preparation of fecal DNA suitable PCR. *Nucleic Acids Research* 23 (18).
18. **Duriez O, Sachet JM, Ménoni E, Pidancier N, Miquel C, Taberlet P .2007.** Phylogeography of the capercaillie in Eurasia: what is the conservation status in the Pyrenees and Cantabrian Mounts?. *Cons. Genet.* 8: 513-526.
19. **Dvorák J, Halverson J, Gulick P. 1992.**cDNA cloning of a Z- and W-linked gene in Gallinaceous birds. *J Hered*; 83:22-25.

20. **Ellegren H. 1996.** First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc Biol Sci.*;263:1635-1641.
21. **Ericsson AW. 1966.** Estudio del estatus del oso de anteojos en Sur América.
22. **Fernando P, Melnick DJ. 2001.** Molecular sexing eutherian mammals. *Molecular Ecology Notes* 1:350-353.
23. **Ferrerira M, Grattapaglia D. 1998.** Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen.
24. **Field D, Chemnick L, Robbins M, Garner K, Ryder O. 1998.** Paternity determination in captive lowland gorillas and orangutans and wild mountain gorillas by microsatellite analysis. *Primates* 39: 199-209.
25. **Frantz AC, Schaul M, Pope LC, Fack F, Schley L, Müller CP, Roper Tj. 2004.** Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. *J. Appl. Ecol.* 41: 985-995.
26. **Frantzen MA, Silk JB, Ferguson JW, Wayne RK, Kohn MH. 1998.** Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol. Ecol.* Oct; 7(10): 1423-8.
27. **Fridolfsson AK., Ellegren H. 1999.** A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J of Avian Biology* 30:116-121.
28. **Gagneux P, Boesch C, Woodruff DS. 1997.** Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol. Ecol.* Sep;6(9): 861-8.
29. **García J, Rey I, Doadrio I. 2003.** Estudio genético del Oso Pardo Cantábrico en Asturias. *Museo Nacional De Ciencias Naturales.* 24-50 p.
30. **Gentry AH. 1986.** Endemism in tropical vs. temperate plant communities. Pp. 153–181. *in: Soule M., (ed.) Conservation Biology.* Sinauer Press, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.

31. **Georges M. 1999.** Towards marker assisted selection in livestock. In proceedings of the 15th Scientific Meeting of the AETE, Lyon, France. 97-103.
32. **Gerloff, U, Hartung B, Fruth B, Hohmann G, Tautz, D.1999.** Intracommunityrelationships, dispersal pattern and paternity success in a wild living community of bonobos (*Pan paniscus*) determined from DNA analysis of faecal samples. *Proc R Soc London B Biol Sci* 266: 1189-1195.
33. **Gibson CW, Gould EE. , Abrems WR, Shen G, Din W , Rosenbloom J. 1992.** Bovine Amelogenin message heterogeneity: alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription. *Biochemistry* 31:8384-8388.
34. **Godoy, J.A., Negro, J.J., Hiraldo, F., Donazar, J.A. 2004.** Phylogeography, genetic structure and diversity in the endangered bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.) as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 13:371-390.
35. **Gompper ME, Gittleman JL, Wayne RK. 1998.** Dispersal, philopatry, and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. *Molecular Ecology* 7: 157-163.
36. **Gonzales A. 1991.** Physical landscape and settlement patterns. Pp. 19–38. in: Black, J.K., (ed.) *Latin America: its problems and its promise*. Westview Press, Boulder, Colorado, U.S.A.
37. **Goossens B, Graziani L, Waits LP, Farand E, Magnolon S, Coulon J, Bel MC, Taberlet P, Allainé D .1998.** Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43: 281-288.
38. **Grant VJ, Irwin RJ.2005.** Follicular fluid levels and subsequent sex of bovine embryos. *J of Experimental Zoology*. 303A:1120-1125.

39. **Griffiths R, Tiwari, B .1993.** Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y-gene in a range of mammal species. *Molecular Ecology* 2:405-406.
40. **Griffiths R, Tiwari B. 1995.** Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature*.;375:454.
41. **Griffiths R., Double, MC, Orr K, Dawson RJG. 1998.** A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7:1071-1075.
42. **Grimwood IR. 1969.** Notas sobre la distribucion y estatus de algunos mamiferos peruanos. Pub. Esp., AMER. Comm. Int. Wildl. Prot, New Cork Zool. Soc. 21:1-86
43. **Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovel-Badge R. 1990.** A gene mapping to the sexdetermining region of mouse Y chromosome is a member of a novel family of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*; 346: 245-250.
44. **Harper JC , Bui T .2002.** Preimplantation genetic diagnosis. Best practice & research clinical obstetrics and gynaecology 16 (5): 659-670.
45. **Hattori K, Burdin AM, Onurna M, Sizuki M, Ohtashi N. 2003.** Sex determination on the sea otter (*Enhydra lutris*) from tissue and dental pulp using PCR amplification. *Canadian Journal of Zool* 81: 52-56.
46. **Huck M, Frantz AC, Dawson DA, Burke T, Roper TJ.2008.** Low genetic variability, female-biased dispersal and high movement rates in an urban population of Eurasian badgers *Meles meles*. *J. Anim. Ecol.* 77: 905-915.
47. **Hughes C. 1998.** Integrating molecular techniques with field methods in studies of social Behavior: a revolution results. *Ecology* 79: 383-399.
48. **IUCN. 1996.** Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland. [18 abril 2012]. Disponible en [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

49. **IUCN. 2011.** Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland. [14 abril 2012]. Disponible en [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
50. **IUCN. 2013.** Red List of Threatened Animals. IUCN, Gland, Switzerland[14 abril 2012]. Disponible en [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).
51. **Izaguirre N, Bizcarra N, Alzualde A, De La Rua C. 2001.** Estimación del sexo a nivel molecular en restos esqueléticos humanos. MUNIBE 53: 143-15.
52. **Koopman P, Munsterberg A, Capel B. 1990.** Expression of a candidate sexdetermining gene during mouse testisdifferentiation. Nature, 348: 450-452.
53. **Largerstrom M, Dahl N, Iselius L, Backman B, Petters Son U. 1990.** Mapping Of the gene for X-linked amelogenesis nperfecta by linkage analysis .Am.J. Hum.Genet.46:120-125.
54. **Leo M. 1993.** The importance of tropical montane cloud forest for preserving vertebrate endemis in Peru: the Río Abiseo National Park as a case study. Pp. 198–211. *in*: Hamilton, L.S. Juvik, J.O., and Scatena, F.N., (eds.) Tropical Montane Cloud Forests. Springer–Verlag,New York, NY.
55. **Lessells C, Mateman A.1998.** Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Mol Ecol.;7:187-195.
56. **López, E, Vásquez N. 2004.** Determinación del sexo y genotipificación del gen de la K–caseína en embriones bovinos. Revevista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17:3.
57. **Malisa A, Gwakisa P, Balthazary S, Wasser S, Mutayoba B. 2005.** Species and gender differentiation between and among domestic and wild animals using mitochondrial and sex-linked DNA markers. African Journal of Biotechnology 4 (11): 1269-1274.

58. **Maravi E, Norgrove L, Amanzo J, Sissa A. 2003.** Identificación preliminar de prioridades para la conservación del Oso de Anteojos (*Tremarctos ornatus*) y el Tapir de Montaña (*Tapirus Pinchaque*) en la Sub-división Perú de la Ecoregión de los Andes del Norte , WWF – Perú Program Office.
59. **Mares MA. 1992.** Neotropical mammals and the myth of Amazonian diversity. *Science* 255:976–979.
60. **Márquez G, Pacheco V. 2010.** Nuevas evidencias de la presencia del Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en las Yungas de Puno, el registro más austral de Perú. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Rev. peru. biol.* 17(3): 377 - 380.
61. **Marshall HD, Ritland K. 2002.** Genetic diversity and differentiation of Kermode bear populations. *Mol. Ecol.* 11: 685-697.
62. **Maturrano L, Aguilar JM, Krüger DP, Chávez IJ , Rosadio AR, Wheeler JC. 2012.** Optimización de una técnica para la extracción de ADN de heces de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). *Rev. Inv. Vet. Perú* 2012; 23 (3): 369-376.
63. **Nardelli M, Túne Z, Juan I, Centrón D, Marcelo H, Cassini. 2011.** Técnicas de muestreo no invasivas Aplicadas al estudio genético De mamíferos. *Interciencias.* Jun. 2011, vol. 36 n° 6.
64. **O'brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merril CR, Bush M. 1983.** The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* 221:459–462.
65. **Orejuela J, Jorgenson J. 1996.** Plan de Acción del Oso Andino. Encuentro Nacional sobre conservación y manejo del oso andino. Ministerio del Medio Ambiente. Colombia. 27 pp.
66. **Page's Marie, Maudet Ce'lia, Bellemain Eva , Taberlet Pierre, Hughes Sandrine , Ha'nni Catherine. 2009.** A system for sex determination from degraded DNA: a

useful tool for palaeogenetics and conservation genetics of ursids. *Conserv Genet*:10:897–907.

67. **Peyton B, Yerena E, Rumiz DI Jorgenson J, Orejuela J. 1998.** Status of wild Andean bears and policies for their management. *Ursus* 10:87-100.
68. **Peytón B. 1980.** Distribución ecológica y hábitos alimenticios de los osos de anteojos (*Tremarctos ornatus*) en Perú. *J. Mammal.* 61: 639-652.
69. **Peyton B. 1987.** Criterios para valorar la calidad del hábitat del oso de anteojos en Machu Picchu, Perú. *Conf. Int. Osos Res. Y admón.* 7:135-143.
70. **Peyton B. 1999.** Plan de acción para la conservación del oso de anteojos. Pp. 157-164 in Servheen, C., S. Herrero, y B. Peyton (compiladores). *Osos. Estudio del estatus y plan de acción para su conservación.* IUCN/SSC Grupos Especializados en Osos y Osos Polares. IUCN, Gland, Switzerland.
71. **Pilgrim KL, Mckelvey KS, Riddle AE, Schwartz MK. 2005.** Felid sex identification based on non-invasive genetic samples. *Mol. Ecol. Notes* 5: 60-61.
72. **Pilot M, Gralak B, Goszczyński J, Posłuszny M .2007.** A method of genetic identification of pine marten (*Martes martes*) and stone marten (*Martes foina*) and its application to faecal samples. *J. Zool.* 271: 140-147.
73. **Pomp D, Good B A, Geisert R D, Corbin C J , A J Conley .1995.** Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine. *J ANIM SCI* 1995, 73:1408-1415.
74. **Rey I, Doadrio I, Palomero G, Taberlet P, Waits L. 2000.** Individualización, determinación del sexo y variabilidad genética del núcleo oriental de oso pardo de la Cordillera Cantábrica. En *La conservación del oso pardo en Europa: un reto de cara al siglo XXI.* Ed. Fundación Biodiversidad.

75. **Roth HH. 1964.** Ein beitrage zur Kenntnis von *Tremarctos ornatus* (Cuvier). *D. Zoolog. Garten* 29:107–129.
76. **Shaw CN, Wilson PJ, White BN. 2003.** “A reliable molecular method of gender determination for mammals”. *Journal of Mammalogy* 84(1): 123-128.
77. **Stucchi M, Torres DA, Soibelzon L. 2001.** Los pariente desaparecidos del Oso Andino (*Tremarctos ornatus*). Sociedad de Ciencias Naturales la Salle. Revista Natura 120. Venezuela.
78. **Taberlet P, Hänni C, Laudet V, Stehelin D. 1994.** Tracking the origins of the cave bear (*Ursus spelaeus*) by mitochondrial DNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12336-12340.
79. **Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N et al .1996.** Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res* 24(16):3189–3194.
80. **Taberlet P, Camarra JJ, Griffin S, Uhre`s E, Hanotte O, Waits LP et al .1997.** Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol Ecol* 6(9):869–876.
81. **Tate GHH. 1931.** Random observations on habits of South American mammals. *J. Mammal.*12:248–256.
82. **The Bear Den (1997).** Spectacled Bear – *Tremarctos ornatus*. Disponible: www.naturenet.com/bears/spectacl.html
83. **Thibier M, Nimbart M. 1995.** The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.

84. **Vanya Janeth Montenegro Vega. 2008.** Desarrollo de una técnica de PCR para determinar el sexo de CSA utilizando muestras de sangre, heces y embriones. tesis de medico veterinario. Lima : Univ.Nac. Mayor de San Marcos.32-39p.
85. **Virta J, Markola J, Peipo J, Markkula M, Vikki. 2002.** Sex determination of bovine embryo blastomeres by fluorogenic probes. *Theriogenology* 57: 2229-2236.
86. **Watson JM, Spendecer JA, Graves JAM, Snead ML, Lau EC.1992.**Autosomal localization of the alelogenin gene in monotremes and marsupials: implications for mammalian sex chromosome evolution.*Genomics* 14:785-789
87. **Weigel KA. 2004.** Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. *Journal of Dairy Sciences* 87 (E. Suppl.): E120-E130.
88. **Welsh J, Mcclelland M. 1990.** Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*; 18:7213-7218.
89. **Whyte JJ, Roberts RM, Rosenfelde CS. 2007.** Fluorescent in situ hybridization for sex determination before and after fertilization in mice. *Theriogenology* 67 (5): 1022-1031.
90. **Williams BW, Etter DR, Linden DW, Millenbah KF, Winterstein SR, Scribner KT. 2009.**Non-invasive hair sampling and genetic tagging of co-distributed fishers and American martens. *J. Wildl. Manag.* 73: 26-34.
91. **Williams R, Figueroa J, Stucchi M, Ruiz J.2011.** Plan de acción regional para la conservación e investigación del oso andino en el corredor biológico Lambayeque – Cajamarca 2011-2016.En: taller de validación: La conservación de los recursos naturales y el desarrollo económico. Lambayeque.
92. **World Wildlife Fund (WWF). 2003.** 1° ed. Colombia: WWF Colombia Communications.

93. **Yamamoto K, Tsubota T, Takeshi K, Atsushi K, Isao K, Tadaaki K. 2002.** Sex Identification of Japanese Black Bear, *Ursus thibetanus japonicus*, by PCR on Amelogenin Gene. J. Vet. Med. Sci 64(6):505-508.
94. **Yerena E. 1994.** Corredores ecológicos en los Andes de Venezuela. Instituto Nacional de Parques y Fundación Polar, Caracas, Venezuela. 87pp.
95. **Young KR. 1992.** Biogeography of the montane forest zone of the eastern slope of Peru. Pp. 119–140. In: Young, K.R. and Valencia, N., (eds.) Biogeografía, ecología, y conservación del Bosque Montano en el Perú. Memorias del Museo de Historia Natural No. 21. Lima.
96. **Zhang B, Li M, Zhang Z, Goossens B, Zhu L, Zhang S, Hu J, Bruford MW, Wei F. 2007.** Genetic viability and population history of the giant panda, putting an end to the “evolutionary dead end”. Mol. Biol. Evol. 24: 1801-18